ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR



SCEAUX. — IMPRIMERIE CHARAIRE.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA SORBONNE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

TOME SEIZIÈME

1902

AVEC QUATORZE PLANCHES

PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN



16me ANNÉE JANVIER 1902 N° 1

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Recherches morphologiques et expérimentales

SUR LE

TRYPANOSOME DU NAGANA OU MALADIE DE LA MOUCHE TSÉTSÉ

PAR MM. A. LAVERAN ET F. MESNIL.

I

APERÇU HISTORIQUE ET RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE.

« Le Nagana, ou maladie de la mouche, dit Bruce[1], qui en a découvert le parasite, est une maladie spécifique qui apparaît chez le cheval, la mule, l'âne, le bœuf, le chien, le chat et beaucoup d'autres animaux, et dont la durée varie de quelques jours à quelques semaines et même quelques mois. Elle est invariablement fatale chez le cheval, l'âne et le chien; mais un léger pourcentage de bovidés guérissent. Elle est caractérisée par la fièvre, par une infiltration de lymphe coagulable dans le tissu sous-cutané du cou, de l'abdomen ou des extrémités, donnant lieu à une enflure de ces régions, par une destruction plus ou

1. DAVID BRUCE, *Preliminary Report on the Tsetse Fly disease or Nagana in Zululand*, Ubombo, Zululand, déc. 1895 (analysé par M. Duclaux dans ces *Annales*, tome X, 1896, p. 189). — *Further Report*, etc., Ubombo, 29 mai 1896; Londres, 1897. — *Nagana* est un mot *zoulou* qui, d'après Bruce, fait allusion à l'état de dépression, d'affaissement de l'animal malade.

moins rapide des globules rouges du sang, un amaigrissement extrême, souvent la cécité, et par la présence constante, dans le sang, d'un parasite infusoire »,... d'un Trypanosome.

Cette maladie que Bruce a étudiée avec tant de soin dans le Zoulouland, sévit dans un grand nombre d'autres contrées de l'Afrique, partout probablement où existe la terrible mouche tsétsé ou une de ses congénères. C'est donc surtout dans les récits terrifiants que les explorateurs de l'Afrique australe et de l'Afrique centrale nous ont laissés des ravages causés par la mouche, qu'il faut chercher la distribution de la maladie dont nous parlons ici.

On la connaît dans les diverses régions du Sud et du S.-E. de l'Afrique (en particulier dans les parties basses et humides où règne aussi le Paludisme), au Congo belge (Scloss, cité par Bruce), dans l'Afrique orientale allemande [1] et anglaise (Stordy), sur les rives du Zambèze (Livingstone), au Togo (possession allemande de la côte des Esclaves) [2], au Soudan [3], en particulier dans la région du lac Tchad (rives du Chari et de ses affluents) [4], dans le pays des Somalis [5], elle existe probablement aussi en Nubie et en Abyssinie [6].

Seul, le nord du continent africain serait indemne de cette terrible maladie; mais nous verrons qu'une autre épizootie à Trypanosomes y sévit sur les Équidés.

1. R. Koch, *Reiseberichte*, etc., Berlin, 1898, p. 65-72, 87-88.

2. R. Koch (*L. c.*, p. 66), en 1895, a observé des Trypanosomes dans des préparations de sang, se rapportant à la maladie de la tsétsé et qui lui avaient été envoyées du Togo. — Tout récemment, Schilling (Bericht über die Surra-Krankheit der Pferde, *Centr. f. Bakter.*, Abth. I, XXX, 30 oct. 1901, p. 545), signale, dans cette contrée, une maladie qui est vraisemblablement le Nagana; il décrit bien le parasite.

3. Il est fort possible que la maladie des chevaux décrite par Dupuy et Pierre (voir entre autres : Cadiot, Du Paludisme chez le cheval, rapport sur le travail de M. Pierre, *Bull. Soc. centr. méd. vétér.*, 30 mars 1896, p. 148), ne soit autre que le Nagana. Mais les renseignements insuffisants fournis par Pierre sur l'hématozoaire prêtent à équivoque et ne permettent pas de se prononcer.

4. D'après les renseignements que M. l'inspecteur général Kermorgant a bien voulu nous communiquer; il les tenait de M. le D[r] Morel, médecin-major de 2[e] classe de l'armée coloniale. — Des échantillons de mouche tsétsé étaient joints à la lettre.

5. Brumpt (*in* Blanchard, *Bull. Acad. médecine*, 3[e] série, XLVI, 29 oct. 1901, p. 400) a eu tous les chameaux de la mission dont il fait partie, tués par une maladie à Trypanosomes à laquelle succombent également les ânes et les mulets.

6. D'après le voyageur anglais James Bruce (XVIII[e] siècle). — Pendant l'expédition anglaise d'Abyssinie (1867), une forte mortalité a sévi sur les animaux de transport. Le vétérinaire Hallen, allant ensuite aux Indes, fut frappé de la ressemblance du Surra avec l'épizootie d'Abyssinie.

L'étude expérimentale commencée par Bruce a été continuée en Angleterre. Un chien « nagané » fut envoyé par Bruce en Angleterre, en novembre 1896; ce fut le point de départ des recherches de Kanthack, Durham et Blandford, exécutées à Londres, puis à Cambridge, de novembre 1896 à août 1898. Un résumé de ce travail d'ensemble sur la maladie de la tsétsé a été publié à la fin de 1898 [1]; il contient de nombreux et intéressants faits expérimentaux. Malheureusement, le travail détaillé n'a pas paru.

Plimmer et Bradford [2] ont continué ces recherches à Londres, en se préoccupant surtout de la morphologie de l'hématozoaire, qu'ils nommèrent *Trypanosoma Brucei*, et de sa distribution dans l'organisme des animaux infectés.

C'est à Cambridge que nous nous sommes également adressés pour nous procurer le virus du Nagana. En l'absence du Dr Herbert E. Durham, miss Florence Durham a bien voulu demander pour nous, au laboratoire de pathologie de l'Université, du sang contaminé, et le Dr W. Mitchell, assistant au laboratoire, nous a envoyé une ampoule de sang citraté de souris, avec de nombreux Trypanosomes. Toutes nos expériences ont eu ce virus pour point de départ. Nous adressons à miss Durham et au Dr Mitchell l'expression de notre cordiale reconnaissance. — Tout dernièrement, Theiler[3], vétérinaire à Prétoria, a publié une étude sur la maladie de la tsétsé.

Dans les trois chapitres qui vont suivre, et où sont exposées nos recherches personnelles, nous chercherons à donner une idée de l'état de nos connaissances sur le *Trypanosoma Brucei* et son action pathogène [4]. Un chapitre final traitera des autres épizooties à Trypanosomes (*Surra*, *Mal de caderas*, *Dourine*), de leur répartition géographique, de leurs ressemblances et de leurs différences avec le Nagana.

1. A.-A. Kanthack, H.-E. Durham et W.-F.-H. Blandford, On nagana or tsetse fly disease, *Proceed. of the R. Society*, LXIV, p. 100.

2. Plimmer et Bradford, Vorlaüfige Notiz über die Morphologie und Verbreitung des in der Tsetsekrankeit (Fly disease oder Nagana) gefundenen Parasiten, *Centr. f. Bakter.* Abth. I, XXVI, 1899, p. 440.

3. A. Theiler, Die Tsetse-Krankheit, *Schweizer-Archiv f. Thierheilkunde*, XLIII, 1901, p. 97.

4. Nous réservons pour un mémoire ultérieur tout ce qui a trait aux essais d'immunisation et de traitement.

II

ANIMAUX SUSCEPTIBLES DE CONTRACTER LE NAGANA. — ANIMAUX RÉFRACTAIRES. — HOMME. — MODES D'INFECTION. — LA MOUCHE TSÉTSÉ. — INOCULATION. — CONDITIONS QUI FAVORISENT OU QUI RETARDENT LE DÉVELOPPEMENT DES TRYPANOSOMES INOCULÉS. — DURÉE DE CONSERVATION *in vitro* DE *Tr. Brucei*. — ACTION DU FROID ET DE LA CHALEUR. — TECHNIQUE.

1° *Animaux susceptibles de contracter le Nagana.* — Alors que la plupart des maladies produites par des Protozoaires sont spéciales à une espèce animale ou à un petit nombre d'espèces voisines, le Nagana peut se développer chez un grand nombre d'espèces de la classe des mammifères.

La liste suivante des espèces susceptibles de contracter le Nagana est déjà longue, et il est bien certain qu'elle est très incomplète : bœuf, buffle d'Afrique ou bubale, mouton, chèvre, plusieurs espèces de grandes antilopes d'Afrique, chameau africain ou dromadaire, cheval, mulet, produits de croisement du zèbre avec le cheval ou l'âne, âne, chien, chat, hyène, lapin, cobaye, rats (blancs et gris), souris, belette, hérisson, singe (macaque).

D'après Kanthack, Durham et Blandford, les moutons et les chèvres d'Afrique sont très résistants au Nagana.

R. Koch a inoculé sans résultat les Trypanosomes du Nagana à des ânes de Massaï et à des produits de ces ânes et des ânes de Maskate. Trois mois et demi après l'inoculation, ces ânes ne présentaient aucun trouble morbide, et, malgré des recherches répétées, on n'avait trouvé aucun Trypanosome dans le sang. A Mombassa, on aurait remarqué aussi l'immunité de ces ânes pour le Nagana [1]. Il est regrettable que les ânes mis en expérience par Koch n'aient pas été suivis plus longtemps et que leur sang n'ait pas été inoculé à des animaux très sensibles au Nagana. Quoi qu'il en soit des ânes de Massaï, il est certain que les ânes appartenant à d'autres races sont très sensibles à la maladie de la tsétsé.

A Klein Popo (Togo, côte ouest d'Afrique), Schilling dit

1. R. Koch, *Reiseberichte*, Berlin, 1898, p. 88.

avoir constaté que les porcs sont réfractaires au Nagana. Les porcs de nos pays ne jouissent pas de la même immunité.

Le 11 décembre 1901, nous avons inoculé un porcelet du poids de 14 kilogrammes en lui injectant sous la peau un demi-centimètre cube de sang riche en Trypanosomes, dilué dans l'eau physiologique citratée. L'examen du sang du porc fait un grand nombre de fois a toujours été négatif, mais une souris inoculée, le 16 décembre, avec le sang du porc, s'est infectée (apparition des Trypanosomes dans le sang de la souris 5 jours après l'inoculation); 2 souris inoculées le 22 décembre avec le sang du porc se sont également infectées.

L'immunité des animaux sauvages des régions centrales de l'Afrique a été admise par quelques observateurs.

Livingstone note que les buffles, les zèbres, les cochons et les antilopes prospèrent dans les pays où sévit la tsétsé[1].

« Il n'y a aucun doute à avoir, écrit Foà, concernant l'innocuité de la piqûre de la tsétsé pour les animaux sauvages, et en particulier pour les buffles et les grandes antilopes[2]. »

Il est évident que les animaux sauvages de la classe des mammifères qui prospèrent dans les pays où sévit la tsétsé, présentent une grande résistance au Trypanosome du Nagana, mais il faut bien admettre qu'un certain nombre au moins de ces animaux sont infectés à l'état permanent; il n'est pas douteux, en effet, que c'est dans leur sang que la tsétsé puise les germes de la maladie, germes toujours présents dans beaucoup de régions de l'Afrique centrale et qui, cependant, ne peuvent pas se conserver, chez la mouche, plus de 48 heures, comme nous le verrons plus loin. Il est bien probable que, chez la plupart des animaux en question, il n'y a pas immunité, mais tolérance très grande pour les parasites, qui arrivent à vivre dans le sang en petit nombre, sans occasionner de troubles graves.

Les indigènes de l'Afrique centrale ont remarqué depuis longtemps que la présence du gros gibier favorisait l'apparition de la maladie de la tsétsé, et tous les observateurs constatent que les régions d'où disparaît le gros gibier s'assainissent, (Foà, Theiler, etc.)

1. D. Livingstone, *Missionary Travels and Researches in South Africa*, 1re édit., 1857.

2. Foa, *Du Cap au lac Nyassa*, Paris, 1897, p. 148.

Bruce n'a jamais vu de Trypanosomes dans le sang des animaux sauvages, mais il a constaté que, inoculé à des animaux domestiques, ce sang pouvait produire, au moins dans certains cas, le Nagana.

Ces très intéressantes observations de Bruce confirment pleinement le rôle attribué aux animaux sauvages dans la propagation du Nagana.

Les animaux sauvages chez lesquels l'expérimentation a révélé l'existence des Trypanosomes, appartenaient aux espèces suivantes : hyène, buffle d'Afrique ou bubale et parmi les antilopides : Wildbeeste = *Catoblepas gnu*, Koodoo = *Strepsiceros capensis*, et Bush buck (?).

Une belette à laquelle Kanthack, Durham et Blandford avaient inoculé le Nagana est morte en quelques jours, un hérisson est mort en 17 jours.

Un singe macaque auquel les mêmes observateurs avaient inoculé des Trypanosomes du Nagana s'est infecté, et il est mort en deux semaines. M. le professeur Nocard a constaté également que les macaques étaient susceptibles de contracter le Nagana[1].

On a vu, dans la partie historique de ce travail, que Brumpt a observé à Imi (frontière occidentale de l'Ogaden, Afrique centrale), sur des chameaux, une épizootie qui était due à des Trypanosomes, *Tr. Brucei* vraisemblablement.

2° *Homme. Animaux réfractaires.* — Alors que tant de mammifères sont susceptibles de contracter le Nagana, l'homme paraît absolument réfractaire à cette redoutable maladie; sans cette heureuse particularité, il lui aurait été impossible de pénétrer dans le centre de l'Afrique.

Tous les voyageurs qui ont traversé les régions où abonde la tsétsé racontent qu'ils ont été piqués des milliers de fois, sans éprouver autre chose que de légers accidents locaux, analogues à ceux que produisent les moustiques. Jamais Livingstone n'a éprouvé le moindre malaise, malgré un séjour de deux mois dans le pays à tsétsé; il note que les enfants étaient fréquemment piqués, sans qu'il en résultât le moindre accident.

Foà raconte qu'il a été piqué des milliers de fois, sans éprouver autre chose que des accidents locaux très légers et un

1. Nocard, *Soc. de biologie*, 4 mai 1901.

état d'agacement et d'irritation contre les tsétsé bien compréhensible[1].

En dehors de la classe des mammifères, on ne connaît aucun animal susceptible de contracter le Nagana.

Les oiseaux sont absolument réfractaires. Nous avons injecté souvent, chez différentes espèces d'oiseaux, des *Tr. Brucei* en grande quantité dans le péritoine ou dans le tissu conjonctif sous-cutané. Lorsqu'on examine au bout de 2 à 3 heures le sang injecté dans le tissu conjonctif, on constate que la plupart des Trypanosomes sont déformés; les formes d'involution sont les mêmes que lorsqu'on soumet du sang riche en Trypanosomes à la température de 41 à 42° pendant quelques heures; nous reviendrons plus loin sur cette action de la chaleur; la température élevée des oiseaux semble jouer un rôle important dans leur état réfractaire pour *Tr. Brucei.*

Dans le péritoine des oiseaux, les Trypanosomes disparaissent plus rapidement encore que dans le tissu conjonctif. Nous nous proposons de continuer l'étude de cette question.

3° *Modes d'infection. La mouche tsétsé.* — Livingstone avait bien observé et bien décrit les effets de la piqûre de la tsétsé sur les animaux domestiques; mais, pendant longtemps, on s'est mépris sur les causes de la nocuité des piqûres faites par cette mouche; on croyait que la tsétsé était venimeuse; plusieurs observateurs ont cherché, vainement d'ailleurs, des glandes à venin chez cet insecte.

C'est à D. Bruce que revient le mérite d'avoir montré que la tsétsé n'est pas venimeuse et que, si ses piqûres sont, en général,

1. Le Dr Barron a observé à Londres, dans le sang d'une dame atteinte d'anémie, des Protozoaires flagellés en grand nombre; cette dame guérit après 2 mois de traitement par l'arsenic, l'aloès et le fer (*The Liverpool medico-chirurgical Journal*, janv. 1895). S'agissait-il dans cè cas de Trypanosomes? Quelle était la nature de ces Trypanosomes? Il nous paraît impossible de répondre à ces questions.

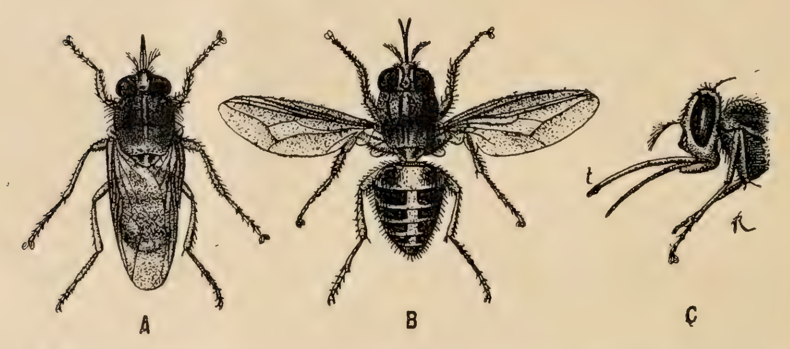
M. le Dr R. Ross, sachant que nous préparions un travail sur le Nagana, a bien voulu nous communiquer le fait suivant qui présente un grand intérêt. Le Dr Dutton a observé à Bathurst (Gambie) des Trypanosomes dans le sang d'un européen qui était atteint d'une fièvre rémittente avec bouffissure de la face, œdème des paupières et des membres inférieurs, fréquence anormale du pouls et de la respiration, faiblesse générale. La rate était augmentée de volume sans qu'on pût accuser le Paludisme. Les Trypanosomes trouvés dans le sang étaient peu nombreux mais typiques, analogues aux Trypanosomes du Nagana.

Pour décider de la nature des Trypanosomes trouvés dans ce cas, il faut attendre la publication de l'observation complète.

si dangereuses, cela tient à ce que la mouche suce alternativement le sang d'animaux atteints de Nagana et d'animaux sains et qu'elle inocule à ces derniers les Trypanosomes pathogènes.

Avant de rapporter les expériences de Bruce, nous croyons devoir donner quelques renseignements sur la mouche tsétsé.

La tsétsé, *Glossina morsitans* Westwood, est un peu plus grande que la mouche domestique, elle mesure 11 millimètres de long (Bruce); les ailes, plus longues que celles de la mouche domestique, se superposent au repos (fig. A). Ses principaux caractères peuvent se résumer comme il suit:



A. B. Mouche tsétsé grossie trois fois, représentée avec les ailes ployées et avec les ailes déployées. — C. Tête d'une mouche tsétsé grossie cinq fois. — t. Trompe (d'après les dessins de D. Bruce).

Tête couleur peau de buffle, armée d'une trompe grêle et longue (t, fig. C) et de deux antennes. Thorax d'un gris roussâtre avec quatre bandes noirâtres longitudinales. Ailes légèrement enfumées. Pattes jaunâtres, derniers articles des tarses bruns. Abdomen jaunâtre composé de six segments, les quatre segments centraux ont chacun une paire de taches ovales brunes; les parties claires dessinent à la partie dorsale une ligne longitudinale médiane coupée transversalement par des bandes jaunâtres (B).

Le vol de la tsétsé à jeun est extrêmement rapide et, comme la mouche aime l'ombre et se cache sous les feuilles, au milieu des poils chez les animaux et dans les replis de la peau, on a de la peine à la voir, mais les effets de la piqûre révèlent rapidement sa présence. A l'entrée dans la contrée de la mouche, dit

Bruce, on n'est pas longtemps à ignorer la présence de la tsétsé; on voit les indigènes frapper leurs jambes nues, les chiens mordre en rond et les chevaux ruer. En quelques minutes, dans les espaces couverts de broussailles, on peut être attaqué par 30 ou 40 mouches.

Les mouches des deux sexes sucent le sang; elles piquent dans la journée et le soir, très rarement la nuit, lorsque le clair de lune est très beau.

Quand la mouche vole près de la tête, on perçoit un bruit d'ailes fugitif en raison de la rapidité du vol.

La mouche se pose avec tant de délicatesse sur la peau qu'on ne la sent pas, la pénétration de l'aiguillon est indolore; en 20 ou 30 secondes, la mouche se gonfle de sang, l'abdomen prend une teinte rose d'abord, puis rouge.

C'est seulement lorsque la mouche s'est déjà gorgée de sang que l'on éprouve une légère démangeaison au point de la piqûre.

Le vol de la mouche gonflée de sang est alourdi; l'insecte repu regagne rapidement la broussaille où il se cache pour digérer en paix[1].

La tsétsé suit le gros gibier, ce qui permet d'espérer que la zone d'infection se restreindra de plus en plus. Au fur et à mesure que les chasseurs s'avancent dans l'intérieur, le gibier recule, entraînant la tsétsé; le jour où l'on aura détruit l'un, écrit Foà, l'autre disparaîtra.

Les expériences de Bruce démontrent d'une manière évidente qu'une mouche tsétsé qui a piqué un animal atteint de Nagana et qui pique ensuite un animal indemne peut transmettre la maladie à ce dernier.

La mouche a encore un pouvoir infectieux 12, 24 et même 48 heures après avoir piqué un animal malade, mais alors l'infection se produit plus difficilement; des piqûres multiples et répétées sont nécessaires. Des mouches nourries sur des animaux infectés, gardées en captivité pendant plusieurs jours et placées ensuite sur deux chiens, n'ont pas infecté ces chiens.

Des mouches capturées dans une localité infectée sont

1. Bruce, Foa, *op. cit.* — Railliet, Art. Mouche du *Nouv. Dict. prat. de méd. chir. et hygiène vétérinaires*, Paris, 1885, et *Traité de zoologie médicale et agricole*, 1895, p. 787.

capables de donner le Nagana à un animal sain, dans une région saine.

Des animaux qui traversent une contrée à Nagana sans boire ni manger, mais qui sont piqués par des tsétsé, contractent le Nagana; l'eau de boisson et l'alimentation qui ont été quelquefois incriminées ne jouent aucun rôle dans l'étiologie de la maladie.

D'autres insectes que la tsétsé peuvent-ils propager le Nagana? D'après Bruce, les mouches autres que la tsétsé qui piquent les animaux ne propagent pas le Nagana.

Les animaux infectés de Nagana qui sont transportés sur la côte, c'est-à-dire dans des régions indemnes de tsétsé, ne transmettent jamais la maladie aux animaux qui vivent avec eux[1].

L'épizootie observée par Brumpt sur des chameaux paraît avoir été propagée non par la tsétsé ordinaire, mais par une *Glossina* très voisine.

Aux Indes, L. Rogers a constaté que le Trypanosome du Surra pouvait être propagé par les mouches de cheval (taons) au chien et au lapin [2].

4° *Inoculations.* — Comme le disent Kanthack, Durham et Blandford, les inoculations du Nagana réussissent toujours, pourvu qu'elles soient sous-épidermiques.

D'après ces auteurs, la quantité de sang à Trypanosomes inoculée est sans importance, une petite quantité étant aussi nuisible qu'une grande; cela est vrai si l'on ne considère que le résultat final, mais la rapidité avec laquelle la maladie évolue varie avec la quantité de sang injectée et aussi avec la voie d'inoculation.

Lorsqu'on inocule le sang à Trypanosomes dans le péritoine ou dans la veine, l'infection est plus rapide que si l'inoculation est faite dans le tissu conjonctif; l'inoculation faite dans le tissu conjonctif au moyen de la seringue donne des résultats plus rapides et plus sûrs que si l'on se contente de déposer des traces du sang à Trypanosomes à la surface d'une écorchure de la peau.

Chez le rat et chez la souris, lorsqu'on inocule dans le péri-

1. Koch, *Reiseberichte...*, p. 65.
2. L. Rogers, *Proceedings of the R. Soc.*, 4 mai 1901, p. 163.

toine du sang très frais, riche en Trypanosomes, les parasites apparaissent dans le sang au bout de 24 heures et quelquefois avant l'expiration de ce délai.

Lorsque du sang très frais, riche en Trypanosomes, est injecté dans le tissu conjonctif sous-cutané de ces animaux, les Trypanosomes apparaissent généralement dans le sang au bout de 36 à 48 heures.

Les rats d'égout s'infectent avec la même facilité et aussi rapidement que les rats blancs ou tachetés.

Chez le cobaye, après inoculation péritonéale, les Trypanosomes apparaissent dans le sang en moins de 4 jours; après inoculation sous-cutanée, du 4e au 7e jour.

Chez le lapin, après inoculation intra-veineuse, on trouve souvent des Trypanosomes en nombre appréciable dès le 2e jour; la date de l'apparition des parasites, après inoculation sous-cutanée, n'a rien de régulier.

Chez le chien, après inoculation sous-cutanée, les parasites apparaissent dans le sang le 2e ou le 3e jour de l'inoculation.

Dans tous ces cas, il s'agit d'inoculations faites avec du sang à Trypanosomes très frais, mélangé, à parties égales, avec de l'eau physiologique; les résultats sont différents si l'on emploie du sang fortement dilué, du sang dans lequel les Trypanosomes sont extrêmement rares ou encore du sang conservé pendant 1 à 3 jours et dans lequel beaucoup de Trypanosomes sont altérés.

L'expérience suivante, faite le même jour sur 6 souris, avec du sang de même provenance, plus ou moins dilué, nous a paru intéressante. La quantité de liquide injectée a été dans tous les cas de un vingtième de centimètre cube.

1° Sang riche en Trypanosomes, dilué à 1 p. 5 dans l'eau physiologique.

Une souris inoculée dans le péritoine est prise au bout de 24 heures et meurt en moins de 3 jours.

Une souris inoculée sous la peau est prise en 2 jours et meurt au bout de 5 jours 1/4.

2° Sang dilué à un pour 500.

Une souris inoculée dans le péritoine est prise en moins de 2 jours et meurt au bout de 4 jours.

Une souris inoculée sous la peau est prise en moins de 4 jours et meurt au bout de 6 jours 1/2.

3° Sang dilué à 1 p. 50,000.

Une souris inoculée dans le péritoine est prise au bout de 4 jours et meurt au bout de 6 jours 1/4.

Une souris inoculée sous la peau est prise au bout de 5 jours et meurt au bout de 7 jours.

Lorsqu'on inocule à une souris ou à un rat du sang très pauvre en Trypanosomes, les parasites n'apparaissent dans le sang que du 5e au 7e jour.

Lorsqu'on injecte du sang conservé à la température du laboratoire depuis 36 ou 48 heures, les Trypanosomes n'apparaissent dans le sang que vers le 9e jour.

Avec le sang qui a été conservé à la glacière ou bien chauffé entre 40 et 43° ou encore mélangé à des substances qui ont affaibli la vitalité des Trypanosomes, on a de même des retards dans l'apparition des parasites dans le sang.

Ces faits sont bien en rapport avec ceux qui se rapportent à l'infection naturelle.

D'après Koch, lorsque les animaux sont infectés naturellement, les Trypanosomes apparaissent dans le sang du 9e au 12e jour, or, les Trypanosomes inoculés par les mouches doivent être, en général, peu nombreux et en assez mauvais état.

D'après Foà, la maladie évolue plus vite chez les animaux qui ont été piqués un grand nombre de fois que chez ceux qui n'ont été piqués que par quelques mouches ; ceci encore est en rapport avec les résultats de l'expérimentation.

Kanthack, Durham et Blandford n'ont pas réussi à infecter les animaux par le sac conjonctival intact.

D'après les mêmes observateurs, l'infection par le coït est improbable.

L'infection par la nourriture n'a lieu que s'il existe des lésions de la bouche ou du museau ; le fait a été bien établi pour le Surra par les expériences de Rogers.

Les fœtus ne sont pas infectés dans l'utérus; nous avons constaté l'absence des Trypanosomes dans le sang de rats qui naissaient de mères en pleine infection de Nagana.

5° *Durée de conservation.* — D'après Bruce, le sang des animaux atteints de Nagana est encore infectieux, quatre jours après qu'il a été recueilli *in vitro*, s'il ne s'est pas desséché ; le

sang desséché peut être encore infectieux au bout de 24 heures, mais c'est là une exception.

Il résulte des recherches de Kanthack, Durham et Blandford que *Tr. Brucei* reste vivant, *in vitro*, de 1 à 3 jours, exceptionnellement de 4 à 6.

Dans des préparations de sang bordées à la paraffine, Plimmer et Bradford ont trouvé quelquefois des Trypanosomes vivants au bout de 5 à 6 jours.

Du sang recueilli avec pureté et conservé au contact de l'oxygène, garde sa virulence au moins pendant trois jours, d'après les mêmes observateurs.

Du sang contenant des Trypanosomes du Nagana, recueilli avec pureté, mélangé à de l'eau physiologique citratée et conservé à la température du laboratoire, peut être encore virulent au bout de trois jours; mais ce n'est pas là un résultat constant; du sang conservé depuis 48 heures seulement a parfois perdu sa virulence.

Nous avons vu déjà que, chez les animaux inoculés avec des Trypanosomes conservés *in vitro*, l'apparition des parasites dans le sang retarde beaucoup; c'est là un fait dont on doit tenir grand compte dans ces expériences, faute de quoi on s'exposerait à noter comme négatives des inoculations dont les effets ne sont que retardés.

Les Trypanosomes se conservent mieux, restent plus longtemps mobiles, dans le sang mélangé à du sérum que dans le sang pur. Nous avons vu des Trypanosomes encore mobiles, au bout de trois jours pleins, dans du sang de rat défibriné et mélangé à parties égales à du sérum de cheval; dans le sang pur on ne trouvait plus, au bout de 24 heures, aucun Trypanosome mobile.

Le sérum humain et celui des animaux réfractaires au Nagana (oiseaux), ne sont pas moins aptes à la conservation des Trypanosomes que les sérums des animaux les plus sensibles.

6° *Action du froid.* — Nous avons signalé la longue conservation à la glacière du Trypanosome des rats, *Tr. Lewisi*[1]. Le Trypanosome du Nagana ne jouit pas de la même propriété, il

1 Laveran et Mesnil, *Soc. de biologie*, 6 octobre 1900, et *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1901, p. 679.

ne se conserve pas mieux à la glacière (5 à 7° au-dessus de zéro) qu'à la température du laboratoire.

L'inoculation du sang conservé trois à cinq jours à la glacière nous a donné, à plusieurs reprises, des résultats négatifs; les résultats peuvent être négatifs alors même qu'on trouve encore, dans les préparations conservées, quelques Trypanosomes un peu mobiles.

Les Trypanosomes se déforment rapidement dans le sang qui est mis à la glacière; nous décrirons plus loin ces altérations, qui ne sont pas spéciales à l'action prolongée du froid. (V. *Formes d'involution.*)

Les mouvements des Trypanosomes sont ralentis par l'action du froid, ils s'accélèrent quand le sang se réchauffe, au sortir de la glacière.

Si les Trypanosomes du Nagana supportent mal l'action prolongée d'un froid modéré, par contre ils résistent très bien à des abaissements brusques de température à 50 et 55° au-dessous de zéro, comme le montrent les expériences suivantes dont nous donnons seulement un rapide résumé.

Exp. 1. — Du sang de rat riche en *Tr. Brucei*, dilué dans l'eau physiologique citratée, est soumis pendant une demi-heure à une température qui varie entre — 15 et — 18° C.

Au bout de deux heures, on trouve dans le sang qui s'est décongelé et réchauffé à la température du laboratoire, beaucoup de Trypanosomes d'aspect normal et mobiles.

Le sang est injecté à deux souris dans le tissu conjonctif sous-cutané; ces souris meurent de Nagana aussi rapidement qu'une souris témoin.

Exp. 2. — Du sang de rat riche en *Tr. Brucei*, dilué dans l'eau physiologique citratée, est soumis pendant 20 minutes à la température de — 15° et ensuite, pendant 8 minutes, à une température de — 25 à — 30°.

Au bout de deux heures, on constate, dans le sang décongelé, la présence de nombreux Trypanosomes d'aspect normal et mobiles.

Deux souris inoculées avec le sang décongelé meurent de Nagana aussi rapidement qu'une souris témoin.

Exp. 3. — Du sang de rat riche en *Tr. Brucei*, dilué dans l'eau physiologique citratée, est soumis pendant une demi-heure à la température de — 15° et ensuite, pendant 5 minutes, à une température de — 50 à — 55°.

Au bout de deux heures, lorsque le sang s'est décongelé et réchauffé, on constate qu'il existe encore beaucoup de Trypanosomes mobiles.

Deux souris inoculées avec le sang soumis à ces basses températures, meurent de Nagana aussi rapidement qu'une souris témoin.

Exp. 4. — Même expérience que la précédente, à cela près que le réchauf-

fement du sang a été brusque et non lent comme dans l'expérience 3. Le sang s'est encore montré virulent; les souris inoculées sont mortes avec un retard sur la souris témoin.

7° *Action de la chaleur.* — Deux éléments interviennent : le degré de la température et le laps de temps pendant lequel le sang a été soumis au chauffage.

Des échantillons de sang chauffés : pendant 3 heures à 40°, pendant 1 heure 20 à 42° se sont montrés encore virulents; d'autres échantillons chauffés : 40 minutes entre 41 et 44° et 20 minutes à 44°, 5 n'ont pas produit l'infection chez les animaux inoculés. Le chauffage à 44 ou 45° tue donc assez rapidement les Trypanosomes, tandis qu'avec les températures de 40 à 43° un chauffage prolongé est nécessaire.

Lorsqu'on examine du sang à Trypanosomes qui a été soumis pendant une heure à la température de 41°, on peut croire que tous les Trypanosomes sont détruits; les parasites sont immobiles, déformés, méconnaissables pour un observateur qui n'aurait pas l'habitude de cet examen, la plupart des parasites sont globuleux et semblent morts, mais le sang injecté à un rat ou à une souris produit encore l'infection, avec un retard.

Chez des animaux inoculés avec du sang chauffé de 1 heure 50 minutes à 3 heures à 40°, nous avons vu apparaître les Trypanosomes dans le sang du 5e au 6e jour.

On verra plus loin que la richesse du sang en Trypanosomes varie beaucoup d'une espèce à l'autre, chez les animaux infectés de Nagana. La température du sang semble jouer un rôle important. Lorsque la température s'élève à 40 ou 41°, les Trypanosomes diminuent beaucoup de nombre dans le sang de la grande circulation. Chez le porcelet dont il est question plus haut, la température rectale s'est maintenue à 40° en moyenne et, chez cet animal, l'examen histologique du sang a toujours été négatif.

Nous n'avons pas seulement étudié l'action du froid et de la chaleur sur les Trypanosomes du Nagana, nous avons soumis ces parasites, *in vitro*, à l'action d'un grand nombre de produits chimiques, pour rechercher, en vue du traitement, la toxicité de ces produits pour *Tr. Brucei.* Nous n'avons pas encore terminé nos recherches sur cette question, nous nous proposons d'y revenir ultérieurement.

8° *Technique pour l'étude de* Tr. Brucei. — L'observation de *Tr. Brucei* dans le sang pur et frais est facile quand les parasites sont nombreux; lorsque les parasites sont en petit nombre, sans être très rares, leur recherche dans le sang frais est encore assez facile : les mouvements de trépidation ou en tourbillon que les Trypanosomes impriment aux hématies permettent de découvrir les hématozoaires, même à un faible grossissement. Mais il arrive souvent que les Trypanosomes sont assez rares dans le sang pour que leur recherche, à l'aide du microscope, devienne très difficile.

Chez certaines espèces animales, l'examen histologique du sang est presque toujours négatif. Pour décider si un animal est infecté ou non de Nagana, on ne doit donc pas s'en rapporter au seul examen histologique; lorsque cet examen est négatif, il faut inoculer du sang de l'animal suspect à un animal sain, facilement infectable, comme la souris ou le rat. Il arrive souvent que les animaux inoculés dans ces conditions, c'est-à-dire avec du sang dans lequel l'examen histologique n'avait pas révélé l'existence des Trypanosomes, s'infectent, mais avec un retard notable dans l'apparition des Trypanosomes ainsi qu'il a déjà été dit.

Lorsqu'on soumet le sang à la centrifugation, les Trypanosomes s'accumulent à la partie supérieure du culot formé par les hématies ; si le sang est extrêmement riche en Trypanosomes, les parasites forment une couche blanchâtre très visible.

Dans les préparations de sang pur qui viennent d'être faites, les mouvements des Trypanosomes sont trop vifs pour être analysés, mais ces mouvements se ralentissent bientôt et alors on distingue bien le flagelle et la membrane ondulante.

Les préparations en goutte pendante sont très utiles pour étudier le phénomène de l'agglutination.

Le sang destiné aux inoculations est pris dans la veine chez le lapin et les gros animaux ; on l'obtient chez le rat par la saignée de la carotide ; le sang est défibriné ou mélangé à de l'eau physiologique citratée qui empêche la coagulation,

L'étude des formes de multiplication de *Tr. Brucei* peut se faire dans le sang ou dans l'exsudat péritonéal d'un rat inoculé, dans le péritoine, avec du sang riche en Trypanosomes.

Le rouge neutre, le bleu de toluidine et le bleu de méthylène

colorent des granulations dans l'intérieur des Trypanosomes vivants, mais ces différentes substances ne colorent bien les parasites que lorsqu'ils sont morts et la coloration se fait alors en masse.

Pour obtenir une bonne préparation colorée des Trypanosomes du Nagana, il faut dessécher le sang en couche mince sur une lame porte-objet, le fixer par l'alcool absolu et colorer par la méthode qui a été préconisée par l'un de nous : éosine — bleu Borrel, tannin[1]. Cette méthode a été exposée déjà dans ces Annales[2], nous croyons donc inutile d'insister. *Tr. Brucei* se colore plus facilement que *Tr. Lewisi*, il suffit de laisser les préparations de sang pendant 5 minutes dans le mélange colorant.

Comme procédés rapides de coloration, nous conseillerons la solution alcoolique de fuchsine ou la solution de phénate de thionine.

III

MORPHOLOGIE DE *Tr. Brucei*. — ASPECTS DANS LE SANG FRAIS ET DANS LES PRÉPARATIONS COLORÉES. — MODE DE MULTIPLICATION. — AGGLOMÉRATION DES TRYPANOSOMES. — FORMES D'INVOLUTION. — DIFFÉRENCES MORPHOLOGIQUES DE *Tr. Brucei* AVEC QUELQUES TRYPANOSOMES VOISINS.

1° Tr. Brucei *dans le sang frais*. — Dans le sang frais, *Tr. Brucei* se présente sous l'aspect d'un vermicule très mobile muni d'une membrane ondulante et d'un flagelle.

Lorsque les mouvements se ralentissent, ce qui arrive rapidement dans les préparations ordinaires, on voit bien les ondulations en forme de vagues de la membrane ondulante.

L'extrémité portant le flagelle est, en général, dirigée en avant pendant les mouvements de progression, on doit donc la considérer comme l'extrémité antérieure.

L'extrémité postérieure est de forme variable, tantôt effilée, tantôt arrondie ou en tronc de cône.

Les mouvements qui s'exécutent au moyen de la membrane ondulante et du flagelle ne sont pas très étendus; le parasite se déplace peu dans le champ du microscope.

1. LAVERAN, *Soc. de biologie*, 9 juin 1900.
2. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1901, p. 680.

On ne distingue, à l'état frais, ni le noyau, ni les granulations qui deviennent très apparents après coloration.

Tous les Trypanosomes ont, à très peu près, la même longueur dans le sang d'un même animal ; on ne rencontre pas, à côté de grands Trypanosomes, des parasites très petits, comme cela se voit pendant la phase de multiplication de *Tr. Lewisi* ; on constate seulement que certains Trypanosomes sont plus larges que les autres et qu'ils présentent deux membranes ondulantes ; ce sont des formes en voie de division dont nous n'avons pas à nous occuper en ce moment.

D'après Bruce, le Trypanosome du Nagana se présenterait avec des aspects différents dans le sang des différentes espèces animales. Chez le chien, le parasite serait épais, ramassé, relativement court, avec une extrémité postérieure mousse ; chez le cheval, ses dimensions seraient presque doublées et l'extrémité postérieure serait effilée.

D'après Plimmer et Bradford, la grosseur et la longueur du parasite varieraient avec la période de la maladie et l'espèce animale : les formes les plus grosses s'observeraient chez le rat, au moment de la mort ; les plus petites, chez le lapin, dans les premiers jours de la maladie.

Nous avons observé *Tr. Brucei* chez différentes espèces animales : rat, souris, cobaye, lapin, chien, cheval, âne, mouton, chèvre, et nous n'avons pas vu des différences aussi importantes que celles signalées par ces auteurs.

Lorsqu'on se contente d'examiner les parasites dans le sang frais, il est facile de commettre des erreurs d'appréciation au sujet de leurs dimensions, la grandeur des hématies qui sert de point de comparaison variant dans les différentes espèces animales. Chez la chèvre, le diamètre des hématies est seulement de 4 μ à 4 μ 1/2 ; chez la souris, il atteint 5 μ 1/2 à 6 μ et chez le lapin 6 à 7 μ ; par suite, si l'on examine des Trypanosomes dans le sang de ces trois espèces, on aura de la tendance à admettre que les parasites sont plus grands chez la chèvre et chez la souris que chez le lapin. Pour se rendre exactement compte des dimensions des Trypanosomes, il est indispensable de faire des mensurations sur des préparations de sang bien fixées et colorées. En procédant ainsi nous avons constaté que *Tr. Brucei* avait, à très peu près, les mêmes

dimensions chez le rat, la souris, le cobaye, le lapin et le chien, soit 26 à 27 μ de long (y compris le flagelle), sur 1 μ 1/2 à 2 μ 1/2 de large. Chez le cheval et chez l'âne, la longueur est plus grande, elle varie de 28 à 33 μ, la largeur restant la même.

2° Tr. Brucei *dans les préparations colorées.* — Après coloration par le procédé indiqué plus haut, la structure de *Tr. Brucei* apparaît clairement ; cette structure présente la plus grande analogie avec celle de *Tr. Lewisi.*

Le protoplasme se colore assez fortement en bleu et on



Fig. 1. Trypanosome du Nagana (*a*, noyau; *b*, centrosome; *c*, membrane ondulante; *d*, flagelle). — Fig. 2. Même trypanosome au début de la division (il existe 2 centrosomes, flagelle et noyau en voie de division). — Fig. 3, 4, 5. Stades plus avancés de division. (Gross. : 2,000 d. environ.)

distingue d'ordinaire dans ce protoplasme, principalement dans la moitié antérieure, des granulations assez grosses qui se colorent fortement (fig. 1).

L'extrémité postérieure du parasite a souvent l'aspect d'un cône tronqué.

Le noyau, situé vers la partie moyenne du corps, est allongé ; on voit à l'intérieur de nombreuses granulations qui se colorent plus fortement que la masse chromatique principale (*a*, fig. 1).

Près de l'extrémité postérieure, un corpuscule arrondi (*b*), se colore plus fortement encore que le noyau. Ce corpuscule, que nous considérons comme un centrosome [1], est souvent entouré d'une petite zone claire.

1. Laveran et Mesnil, *Soc. de biologie*, 17 nov. 1900 et 29 mars 1901.

Le flagelle, libre à la partie antérieure (*d*), se continue en arrière, le long de la membrane ondulante (*c*), dont les plis sont rendus très apparents grâce à cette bordure, et va aboutir au centrosome.

Bien que le flagelle semble séparé du centrosome par un petit espace clair, il n'est pas douteux qu'il n'y ait continuité de ces parties. En étudiant plus loin les formes d'involution, nous verrons qu'il est commun de rencontrer des flagelles libres encore en continuité avec le centrosome, alors que le protoplasme et le noyau ont disparu.

3° *Formes de multiplication.* — Bruce admet que la multiplication se fait par division longitudinale, mais il se contente d'énoncer cette opinion en quelques mots.

Kanthack, Durham et Blandford n'ont pas vu les formes de multiplication du parasite, ils signalent l'existence dans les ganglions lymphatiques, dans la moelle des os et dans la rate, de petits éléments de 1 à 2 μ de diamètre, de forme ovale, avec ou sans un court flagelle, qu'ils sont disposés à considérer comme des formes jeunes du parasite.

D'après Plimmer et Bradford, il existerait pour le Trypanosome du Nagana deux modes de reproduction : 1° division directe (longitudinale ou transversale); 2° reproduction précédée d'une conjugaison aboutissant à la formation de corps amiboïdes et de plasmodes qui se trouveraient dans la rate; ces derniers corps, en se segmentant, donneraient naissance à des éléments flagellés. Ce deuxième mode de multiplication serait plus commun que le premier.

Nous avons vu plus haut qu'à l'examen du sang frais on distingue des Trypanosomes, plus larges que les Trypanosomes ordinaires, qui ont deux membranes ondulantes, quelquefois deux flagelles. La simple observation du sang frais montre donc qu'il existe une multiplication par division longitudinale. Pour se rendre compte des différentes phases de la division, il est nécessaire d'examiner des préparations colorées.

Chez les animaux infectés de Nagana, on trouve toujours des formes en voie de division dans le sang; l'étude de ces formes est donc plus facile que pour *Tr. Lewisi* qui a une période de multiplication restreinte, après laquelle on ne voit plus, dans le sang, que des formes adultes.

Les figures 2, 3, 4 et 5 représentent les différentes phases de la division d'un Trypanosome du Nagana [1].

Le Trypanosome qui va se diviser augmente de volume, il s'élargit surtout. Le centrosome, le flagelle, le noyau et le protoplasme se divisent successivement, le centrosome se divisant toujours le premier.

A. *Division du centrosome et du flagelle.* — Le centrosome s'allonge, puis se divise en deux corpuscules arrondis placés d'ordinaire l'un au-dessus de l'autre (fig. 2); en même temps, la partie du flagelle adjacente au centrosome s'épaissit et se dédouble.

Les figures 2, 3 et 4 représentent différentes phases du dédoublement du flagelle. Dans la figure 4, les flagelles de nouvelle formation sont indépendants jusqu'au point où le flagelle devient libre; le flagelle se divise parfois dans toute sa longueur.

B. *Division du noyau.* — Le noyau augmente de volume, il s'allonge, la chromatine s'accumule aux extrémités (fig. 2), enfin les noyaux de nouvelle formation se séparent (division directe). D'abord accolés, les noyaux s'éloignent bientôt l'un de l'autre (fig. 3, 4); leur forme est en général ovalaire.

C. *Division du protoplasme.* — Le protoplasme se sépare en deux parties à peu près égales autour des noyaux; sur les préparations bien colorées, cette division est très apparente : un espace clair sépare les deux masses de protoplasme colorées en bleu.

Les deux parasites restent accolés quelque temps, ce qui explique qu'on puisse voir, dans le sang frais, de larges parasites avec deux membranes ondulantes.

Le parasite reste mobile pendant toute la période de division, la mobilité est seulement un peu diminuée.

La séparation peut commencer par la partie antérieure, comme dans la figure 5, ou par la partie postérieure.

Il arrive quelquefois que les deux parasites résultant de la division d'un Trypanosome se divisent eux-mêmes, avant que la séparation du protoplasme soit complète, mais c'est là une exception rare.

1. LAVERAN et MESNIL, Sur le mode de multiplication du Trypanosome du Nagana, *Soc. de biologie*, 23 mars 1901.

L'exsudat péritonéal des animaux inoculés dans le péritoine, les ganglions lymphatiques, la rate, examinés avec soin, ne nous ont pas montré d'autres formes de multiplication. Nous n'avons pas vu les petits éléments que Kanthack, Durham et Blandford ont décrits comme des formes jeunes du Trypanosome du Nagana; nous n'avons pas observé davantage les formes amiboïdes et plasmodiales de Plimmer et Bradford; en étudiant plus loin l'agglutination des Trypanosomes du Nagana et les formes d'involution, nous aurons l'occasion de revenir sur cette question et nous dirons comment Plimmer et Bradford ont pu être conduits à admettre l'existence de conjugaisons et de formes plasmodiales.

Le mode de multiplication de *Tr. Brucei* est en somme des plus simples : il s'agit toujours d'une division longitudinale ; quand les deux Trypanosomes résultant de la division se séparent, ils ont à peu près le même volume. Les formes de multiplication, dans le sang frais, ne diffèrent le plus souvent des formes ordinaires que par leur plus grande largeur; on s'explique ainsi que les auteurs qui n'avaient pas à leur disposition une méthode de coloration leur permettant de suivre les différents stades de la division, aient pu méconnaître le mode de multiplication de ces parasites. On est toujours enclin à rechercher, comme formes de multiplication d'un parasite, de petites formes, et ici, par suite du mode de division, les formes jeunes ont à très peu près le même volume que les adultes.

Schilling n'a observé, comme nous, qu'un mode de division de *Tr. Brucei*, la division longitudinale.

4° *Agglomération des Trypanosomes.* — Dans un certain nombre de conditions, les Trypanosomes du Nagana se groupent d'une façon très régulière, comme font les Trypanosomes des rats [1]. Le phénomène de l'agglomération ou de l'agglutination est moins remarquable pour *Tr. Brucei* que pour *Tr. Lewisi*, mais il faut tenir compte de ce fait que, chez *Tr. Lewisi*, les plus belles agglomérations sont produites par le sérum des animaux immunisés et que, jusqu'ici, on n'a pas réussi à immuniser des animaux contre *Tr. Brucei*.

Les Trypanosomes du Nagana se réunissent souvent par

1. Laveran et Mesnil, *Soc. de biologie*, 17 nov. 1900, et *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1901, p. 690.

deux; dans certaines conditions, ils forment des agglomérations primaires en rosaces; on observe rarement les grandes agglomérations secondaires qui sont communes dans le sang contenant *Tr. Lewisi*.

Les Trypanosomes s'accolent toujours par leur partie postérieure, il est facile de s'en assurer dans les préparations colorées. La figure 12 représente des Trypanosomes agglomérés en rosace, vus dans le sang frais; la figure 13 montre deux Trypanosomes accolés, vus dans une préparation colorée, les deux extrémités postérieures sont aplaties et l'on a de la peine à voir la ligne de séparation des parasites.

Ces Trypanosomes accolés par deux font penser à une conjugaison, mais cette interprétation n'est pas admissible; l'agglomération ne s'observe pas dans le sang pur et frais, elle ne se produit que dans des conditions que l'on peut qualifier d'anormales; de plus le nombre des individus qui s'agglomèrent est très variable.

Avec *Tr. Brucei*, comme avec *Tr. Lewisi*, on peut voir les agglomérations se défaire après un temps variable.

Nous avons vu des agglomérations de Trypanosomes se former dans du sang pur retiré du cœur depuis une 1/2 heure ou 1 heure, dans des exsudats péritonéaux, après injection dans le péritoine de rats ou de souris de sang riche en Trypanosomes, dans du sang mélangé d'eau physiologique, conservé depuis 24 heures à la glacière ou bien chauffé une 1/2 heure à 41°.

En mélangeant, à parties égales, du sang de rat ou de souris défibriné, riche en Trypanosomes, et du sérum de cheval, nous avons obtenu de belles agglomérations persistantes. Les Trypanosomes se déforment au bout de quelques heures.

En mélangeant une partie de sérum de cheval à dix parties de sang, il ne se produit pas d'agglomérations. Le sérum du sang de porc a donné aussi de belles agglomérations.

Le sérum de mouton, mélangé à parties égales à du sang de rat ou de souris riche en *Tr. Brucei*, a donné, dans un cas, de belles agglomérations; dans un autre cas, des agglomérations moins belles et non persistantes.

Le sérum de chèvre a donné, à parties égales, de petites agglomérations non persistantes.

Le sérum du sang humain ne s'est montré ni agglutinant, ni microbicide.

Les sérums suivants mélangés, à parties égales, avec du sang de rat ou de souris riche en *Tr. Brucei* n'ont pas montré de propriétés agglutinantes : sérum de rat normal ou immunisé contre *Tr. Lewisi* et agglutinant ces Trypanosomes, sérum de poule normale, sérum de poule inoculée à plusieurs reprises avec *Tr. Brucei*, sérum d'oie normale, sérum d'oie inoculée à plusieurs reprises avec du sang riche en Trypanosomes du Nagana.

Si l'on ajoute à quelques gouttes de sang riche en *Tr. Brucei* une goutte d'eau légèrement acidulée par l'acide acétique, on voit les Trypanosomes s'agglomérer et se déformer rapidement. En ajoutant une goutte d'eau alcalinisée faiblement par la soude, on n'observe pas d'agglomération.

Les Trypanosomes morts tendent encore à s'agglomérer, mais alors l'agglomération se fait très irrégulièrement.

5° *Formes d'involution.* — Lorsque les Trypanosomes du Nagana se trouvent dans des conditions de vie défavorables, conditions qui toutefois ne déterminent pas la mort rapide des parasites, ils présentent des formes d'involution qu'il importe de connaître. Nous avons observé ces formes dans des circonstances variées : sang de rat riche en Trypanosomes, mélangé à du sérum d'autres animaux et conservé quelques heures en goutte pendante ou dans des préparations ordinaires, sang chauffé à 41 ou 42° pendant 1 heure ou plus; sang injecté dans le péritoine ou dans le tissu conjonctif d'oiseaux et examiné au bout de 1 à 3 heures; sang mis à la glacière ou soumis à la congélation ; sang de rats traités par l'arsenic, etc...

Les figures 6 à 11 représentent différents aspects de *Tr. Brucei* en voie d'involution.

Le Trypanosome se raccourcit, se ramasse sur lui-même (fig. 6), puis se met en boule (fig. 7); on voit, après coloration, dans les Trypanosomes en boules : le noyau, le centrosome et le flagelle. La figure 8 représente un Trypanosome qui était en voie de division lorsqu'il s'est mis en boule, on distingue : 2 noyaux, 2 centrosomes et 2 flagelles.

Les Trypanosomes qui se sont mis en boules peuvent former de petites agglomérations (fig. 9); il est très probable que ce sont ces agglomérats qui ont été vus par Plimmer et Brad-

ford et signalés par eux comme des plasmodes donnant naissance à des éléments flagellés.

Les Trypanosomes qui se sont mis en boules et qui ne sont plus animés d'aucun mouvement ne sont pas toujours morts; si l'on injecte du sang ne contenant plus que des éléments parasitaires ainsi déformés à un rat ou à une souris, on voit parfois les Trypanosomes apparaître dans le sang, avec un retard plus ou moins grand, suivant le degré d'altération des parasites.

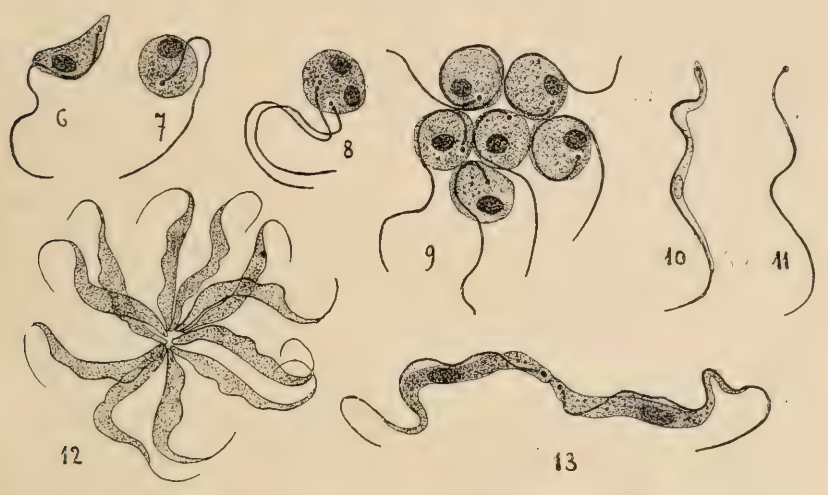


Fig. 6, 7, 8. Mise en boule des Trypanosomes dans du sang mélangé à du sérum de cheval. La figure 8 représente un Trypanosome qui était en voie de division quand il s'est mis en boule. — Fig. 9. Agglomération de Trypanosomes mis en boules. — Fig. 10. Trypanosome en voie de désintégration, le protoplasme a disparu en grande partie, le noyau est très pâle. — Fig. 11. Flagelle libre avec le centrosome. Les fig. 6 à 11 ont été dessinées à un grossissement de 1400 diamètres. — Fig. 12. Trypanosomes agglomérés en rosace vus dans le sang frais. Grossissement 1000 diamètres. — Fig. 13. Deux Trypanosomes accolés par leur partie postérieure vus dans du sang desséché et coloré. Grossissement 1600 diamètres.

Si les Trypanosomes restent soumis à l'action d'influences nocives, ils meurent et subissent des altérations profondes caractérisées comme il suit, dans les préparations colorées : le protoplasme disparaît le premier, il ne se colore plus; la forme du parasite n'est plus indiquée que par une ligne de contour très fine (fig. 10); le noyau pâlit; à un stade d'altération plus avancé, le protoplasme et le noyau ont disparu, on ne voit plus

que le flagelle avec le centrosome qui forme un petit renflement à une de ses extrémités (fig. 11), ou bien le flagelle seul.

6° *Diagnostic différentiel de* Tr. Brucei *avec quelques Trypanosomes voisins.* — Nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier des Trypanosomes provenant d'animaux atteints de Surra et de les comparer aux Trypanosomes du Nagana, nous ne pouvons donc pas nous prononcer sur la question d'identité ou de non-identité de ces parasites.

Nous avons pu examiner les Trypanosomes trouvés par M. Elmassian dans le sang des Équidés atteints par l'épizootie appelée Mal de caderas; ces Trypanosomes ont la plus grande ressemblance avec ceux du Nagana.

Le Trypanosome des rats, *Tr. Lewisi*, est facile à distinguer de *Tr. Brucei*, même si l'on ne tient compte que des caractères morphologiques des deux parasites.

Tr. Lewisi est plus mince, plus effilé que *Tr. Brucei ;* sa membrane ondulante est moins large, moins plissée que celle de ce dernier.

Le protoplasme de *Tr. Lewisi* se colore moins fortement que celui de *Tr. Brucei ;* on trouve en général, dans le protoplasme de ce dernier, des granulations chromatiques plus nombreuses et plus grosses que dans le protoplasme du premier.

L'extrémité postérieure de *Tr. Brucei* a souvent l'aspect d'un cône tronqué, alors que, chez *Tr. Lewisi*, cette extrémité est toujours effilée, mais à ce point de vue, on trouve dans les deux espèces des individus qui ne diffèrent pas sensiblement.

Les formes de multiplication, très différentes dans les deux espèces, sont beaucoup plus variées chez *Tr. Lewisi* que chez *Tr. Brucei*[1].

Il est facile d'avoir des préparations de sang qui contiennent ces deux parasites; il suffit, comme l'a fait Koch, d'inoculer *Tr. Brucei* à un rat déjà infecté de *Tr. Lewisi*. Nous avons répété à plusieurs reprises, avec succès, cette expérience. Lorsqu'on examine le sang frais des rats ayant ainsi une double infection, il est difficile de distinguer les deux espèces de parasites (en dehors des formes de reproduction qui peuvent d'ailleurs man-

1. Laveran et Mesnil, *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1901, p. 686. Comparer les figures représentant les formes de multiplication de *Tr. Lewisi* avec les figures 2 à 5 de ce mémoire.

quer complètement pour *Tr. Lewisi*), mais, sur les préparations colorées, le diagnostic différentiel, basé sur les caractères énumérés plus haut, ne présente pas de difficultés.

Le Trypanosome de la Dourine a une grande ressemblance avec le Trypanosome du Nagana; cependant il existe des différences morphologiques appréciables, surtout sur les préparations colorées.

Dans le sang des Équidés, *Tr. Brucei* atteint des dimensions supérieures à celles de *Tr. equiperdum*[1] qui ne dépasse guère 26 à 28 μ de long.

Tr. Brucei est plus large que *Tr. equiperdum*; son protoplasme se colore plus fortement par la méthode que nous préconisons et on trouve presque toujours, dans ce protoplasme, des granulations chromatiques assez grosses qui font défaut chez *Tr. equiperdum*.

Nous avons vu, dans le sang des animaux dourinés, des formes de division longitudinale tout à fait semblables à celles de *Tr. Brucei*; il ne semble donc pas que les formes de division puissent servir ici au diagnostic différentiel.

IV

MARCHE DE LA MALADIE CHEZ LES DIVERS MAMMIFÈRES. — ANATOMIE PATHOLOGIQUE.

Tous les mammifères expérimentés jusqu'à ce jour sont, à de très rares exceptions près, plus ou moins sensibles au Nagana. Nous avons eu l'occasion d'étudier l'évolution de cette maladie chez un grand nombre de mammifères appartenant à des espèces variées[2]. Dans tous les cas, les animaux étaient inoculés avec du sang contenant de nombreux Trypanosomes, provenant d'autres animaux morts ou vivants. Les inoculations étaient faites, dans la plupart des cas, sous la peau; quelquefois (rats, souris, cobayes) dans la cavité péritonéale; d'autres fois (lapins) dans la

1. Nous avons proposé (*Acad. des Sc.*, 15 juillet 1901) de donner au Trypanosome de la Dourine le nom de *Tr. Rougeti*; la dénomination de *Tr. equiperdum*, employée par Doflein, est antérieure et doit être acceptée par conséquent.

2. Nous adressons nos remerciements à M. le professeur Nocard qui nous a donné ses observations sur la marche de la maladie chez diverses espèces animales.

veine. Dans un chapitre précédent, nous avons parlé de l'importance de la porte d'entrée et surtout de la dose inoculée sur la durée d'incubation de la maladie. Pour les descriptions qui vont suivre, il s'agira toujours de l'inoculation d'une dose appréciable de Trypanosomes, en général comprise entre 1/20e de c. c. et 1 c. c. (suivant la grosseur des animaux inoculés) d'une dilution de sang avec très nombreux Trypanosomes (1 pour 1 ou 2 hématies) dans 4 à 5 fois son volume d'eau physiologique citratée; l'injection de la dilution était toujours faite peu d'heures après la sortie du sang des vaisseaux.

La maladie évolue très différemment suivant l'espèce animale employée. Elle offre toujours ce caractère général d'être une infection sanguine; les Trypanosomes apparaissent dans la circulation au bout d'un temps variable et persistent jusqu'à la mort : le sang des animaux « naganés » est, en effet, virulent. Mais, au point de vue de l'abondance des Trypanosomes, on a les plus grandes variations; ils peuvent arriver à être aussi nombreux que les hématies chez certains animaux (rats, souris), tandis que chez d'autres (une partie des lapins et des cobayes, chèvre, mouton, etc.), il est tout à fait rare et exceptionnel de découvrir des parasites à l'examen microscopique. La mort peut se produire en 2 jours 1/2 (rats inoculés intrapéritonéalement), ou seulement au bout de plusieurs mois. Un petit pourcentage de bovidés, d'après Bruce, recouvrent la santé. Les symptômes morbides sont inappréciables chez certains animaux, très nets chez d'autres (lésions de la peau, des muqueuses, œdèmes du ventre et des membres, etc). Enfin, la marche de la température est très variable suivant les animaux et surtout suivant leur taille; ainsi, les gros animaux (cheval, âne, etc.) présentent de fortes poussées de température avec une fièvre rémittente ou intermittente irrégulière.

Toutes ces considérations nécessitent une étude spéciale de l'évolution de la maladie chez les diverses espèces.

A. *Souris et Rats.* — Chez ces animaux, la maladie suit une marche d'une régularité parfaite. Aucun symptôme ne révèle sa présence. Jusqu'aux approches de la mort, l'animal mange bien et paraît en excellente santé.

Dans la dernière heure ou même seulement la dernière demiheure de leur existence, les souris paraissent somnolentes; leur

poil se hérisse et elles meurent sans manifester la moindre souffrance, avec quelques légers phénomènes de dyspnée. Une seule souris a présenté de vifs phénomènes convulsifs précédant immédiatement une période agonique qui a duré près de 2 heures.

Un certain nombre de rats succombent comme les souris; mais la majorité, peu de minutes avant la mort et alors qu'ils paraissaient encore en bonne santé, se montrent subitement en proie à une grande agitation; ils tournent avec vivacité dans leur bocal, grattent le grain avec force et l'éparpillent au loin; puis, l'animal présente de véritables convulsions; souvent il pousse des cris; il succombe bientôt. — Kanthack, Durham et Blandford ont noté brièvement les mêmes faits.

Les Trypanosomes commencent à pouvoir être découverts au microscope, dans le sang, 2 jours (ou rarement 3) après l'injection sous-cutanée, mais on en trouve moins de 24 heures après l'injection intrapéritonéale. Dans ce dernier cas, comme nous avons déjà eu l'occasion de le signaler, il y a une multiplication intrapéritonéale très active et très abondante des Trypanosomes.

A partir du moment de l'apparition des Trypanosomes dans le sang et jusqu'à la mort, les parasites vont sans cesse en augmentant[1] et finissent, dans les dernières 12 à 24 heures, à être aussi nombreux que les hématies.

L'animal ne paraît pas présenter de sensibles variations de température. Nous avons observé avec soin la marche de la température chez deux rats de même poids, inoculés dans les mêmes conditions. L'un a montré, avant comme après l'inoculation, une température oscillant entre 37 et 38°. L'autre a eu, 2 jours et 5 jours après l'inoculation, des poussées à 38°,8; il est mort 2 heures après la seconde poussée.

Quand l'inoculation a été faite dans le péritoine, la mort survient chez les rats de taille petite ou moyenne, en 2 jours 1/2, chez les souris en 3 jours (exceptionnellement en 2 jours 1/2). Quand l'inoculation a eu lieu sous la peau, la mort ne se produit qu'en 3 jours 1/2 à 5 jours 1/2; il y a quelques variations individuelles. Presque toutes nos expériences ont été faites avec des souris blanches

1. Avec du virus frais et non mélangé d'autres substances, nous n'avons jamais eu d'exception à cette règle.

et des rats blancs ou pie (variétés de *Mus rattus*). Des rats d'égout (*Mus decumanus*) de 200 à 250 grammes ont succombé en 4 jours 1/2, exactement comme des rats blancs inoculés dans les mêmes conditions. Un rat dératé (depuis 8 jours) a succombé exactement comme un témoin. Il en a été de même de rats fortement vaccinés contre le *Tr. Lewisi*.

Ces chiffres, que nous avons constamment obtenus dans nos très nombreuses expériences, sont notablement différents de ceux donnés par Kanthack, Durham et Blandford. Leurs souris mouraient au bout de 8 à 25 jours (moyenne 13 jours), et leurs rats au bout de 6 à 26 jours (moyenne 12 jours); la période d'incubation était de 3 à 4 jours (sauf dans le cas d'injection intra-péritonéale). Le virus dont nous nous servons est le même que celui employé par ces savants. Les différences entre leurs résultats et les nôtres peuvent tenir, pour une part, aux doses inoculées ; nos prédécesseurs ne sont pas très explicites à cet égard. Mais, en plus, nous croyons qu'il faut faire intervenir une variation dans la virulence des Trypanosomes, survenue sans doute à la suite des nombreux passages par petits animaux de laboratoire.

B. Lapins. — Autant la maladie, chez les rats et les souris, affecte une régularité parfaite dans son incubation et sa durée, autant elle présente de variations chez le lapin. — S'il s'agit d'un lapin de faible poids, avec tendance à la cachexie, la maladie est de courte durée; les Trypanosomes peuvent être reconnus à l'examen microscopique au bout de 2-3 jours ; ils ne cessent d'être assez nombreux dans le sang pour être toujours décelables à l'examen direct ; la marche de l'infection n'est pas toujours régulière; il peut y avoir diminution du nombre des parasites dans le sang, suivie d'une nouvelle poussée. En tout cas, dans les jours qui précèdent la mort, le nombre des Trypanosomes va en augmentant et, au moment de la mort, il y en a environ 1 pour 50 hématies.

Cette mort survient de 5 à 12 jours après l'inoculation. L'animal ne présente aucune lésion durant la vie, sauf un œdème au point d'inoculation.

Ces lapins montrent parfois une poussée de température au moment de l'apparition des Trypanosomes dans le sang.

Si l'on prend des lapins en bonne santé, la marche de la

maladie est généralement plus longue, de 12 à 40 jours et même plus. Les Trypanosomes sont toujours rares dans le sang. Chez la plupart des lapins, malgré un examen microscopique journalier, minutieux, on n'aperçoit rien ; ou bien, quand l'examen est positif, on ne distingue qu'un très petit nombre de parasites; mais, dans tous les cas, le sang, inoculé à une souris, se montre virulent, seulement la période d'incubation est de 4-5 jours (au lieu de 2). Souvent, même au moment de la mort du lapin, les Trypanosomes sont très rares dans le sang.

L'animal, sauf dans les derniers temps de la vie, ne diminue pas de poids. — Mais au bout de 12 à 20 jours, des symptômes locaux font leur apparition. Ils affectent d'une part la tète, et en particulier le nez et les yeux, d'autre part les organes génitaux et l'anus.

Il se produit tout d'abord un peu de blépharo-conjonctivite et de coryza. Bientôt surviennent des œdèmes qui se localisent surtout à la tête, à l'anus et aux parties génitales. Dans la plupart des cas, l'œdème est surtout apparent à la base des oreilles, à l'anus, à la vulve ou bien au fourreau de la verge; on observe des congestions des testicules ou de véritables orchites.

Le poil tombe autour des yeux et du nez, à la base des oreilles; quelquefois, quoique rarement, il se forme des plaques dénudées de poils au ventre ou à la partie dorsale.

La blépharo-conjonctivite s'aggrave et devient purulente ; il se forme des croûtes qui agglutinent les paupières. Le pus s'accumule alors derrière les paupières et la cornée ne tarde pas à s'altérer; elle s'opacifie rapidement. Si l'on n'a pas soin de laver les yeux des animaux et d'empêcher la stagnation du pus, ils deviennent aveugles.

Des ulcérations se forment enfin autour du nez et des yeux, quelquefois sur d'autres parties du corps. Ces ulcérations, couvertes de pus ou de croûtes, ont une grande analogie avec celles qui existent chez les lapins infectés de Dourine. A la dernière période, la respiration devient difficile et la mort ne tarde pas alors à se produire. — La présence des Trypanosomes peut être constatée quelquefois dans la sérosité des œdèmes et en nombre plus élevé que dans le sang; mais, en règle générale, là, comme dans le sang, les Trypanosomes sont très rares.

Tout le cortège de symptômes externes que nous venons de

mentionner ne se présente que chez les lapins qui survivent de 25 à 40 jours à l'inoculation ; chez les autres, l'évolution des lésions est arrêtée par la mort.

Il n'y a aucune régularité dans la marche de la température. Dans les 8 à 10 jours qui suivent l'inoculation, elle reste au-dessous de 40°; puis on a une fièvre intermittente avec poussées irrégulières entre 40 et 41°, dépassant rarement 41°. Ces poussées ne paraissent pas coïncider nécessairement avec des poussées dans le nombre des parasites. Nous avons parfois vu la première poussée de température coïncider avec l'apparition des œdèmes.

Nos résultats avec les lapins sont d'accord avec ceux des savants anglais ; ils indiquent 8 jours comme durée de l'incubation; la mort survenait en 13 à 58 jours (moyenne 30 jours).

C. *Cobayes.* — Kanthack, Durham et Blandford regardent le cobaye comme un animal relativement peu sensible au Nagana : période d'incubation, 5 à 7 jours; mort en 20 à 183 jours (moyenne 50 jours).

Dans nos expériences, le cobaye s'est montré aussi sensible que le lapin. La majeure partie de nos animaux ont succombé de 15 à 30 jours après l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale; quelques-uns sont morts 5-6 jours après; d'autres ont survécu 46 et 61 jours à l'injection.

L'apparition des Trypanosomes dans le sang est parfois assez rapide, 2 à 4 jours après l'inoculation; quand l'injection est faite dans le péritoine, il y a multiplication abondante des Trypanosomes dans cette cavité.

Sauf dans les cas où la mort survient rapidement, le nombre des parasites du sang ne suit pas une marche ascensionnelle régulière [1]. On découvre, à l'examen microscopique, des parasites durant quelques jours, puis on ne voit plus rien les jours suivants ; les Trypanosomes reparaissent et ainsi de suite. En règle générale, les parasites sont moins rares dans le sang que dans le cas du lapin.

Chez les 2 cobayes qui ont résisté 46 et 61 jours, les Trypanosomes ont été visibles au microscope du 5e au 11e jour après

1. Chez un cobaye qui a survécu 13 jours 1/2 à l'inoculation, les Trypanosomes ont été assez nombreux dans le sang du 3e au 10e jour; ils étaient très nombreux le jour de la mort. — Chez certains cobayes, on observe des parasites, en nombre variable, tous les jours, à l'examen microscopique.

l'inoculation, puis on n'a pu les rencontrer à l'examen microscopique que dans les derniers jours de la maladie, le dernier jour seulement chez le 1er de ces cobayes.

Lorsque la maladie dure plus de 20 jours, un certain nombre de cobayes montrent des lésions des yeux (perte des poils autour des yeux, un peu de conjonctivite purulente), de l'œdème de la vulve ou du fourreau et de l'anus. — Mais ces lésions sont toujours peu accentuées ; elles ne sont jamais comparables, comme intensité, à celles du lapin ; dans les derniers jours de la vie, elles ont souvent une manifeste tendance à la guérison.

Pendant toute la durée de la maladie, le cobaye montre une fièvre continue avec de rares intermittences : la température est généralement au-dessus de 40.

D. *Chiens*. — Bruce, au Zoulouland, a expérimenté sur un grand nombre de chiens. Il s'est servi de ces animaux pour mettre en évidence le rôle de la mouche tsétsé et la présence de Trypanosomes chez les mammifères sauvages. — « La maladie, dit-il, est à marche rapide (8 à 16 jours) et invariablement fatale. Les principaux symptômes sont l'extrême amaigrissement, l'enflure des extrémités, sur le corps, une éruption de pustules renfermant une matière plus ou moins purulente, et finalement une opacité laiteuse de la cornée amenant la cécité. » L'animal, à partir du moment de l'apparition des Trypanosomes dans le sang, c'est-à-dire du début de la maladie, a une fièvre continue (parfois avec rares intermittences), avec poussées entre 40 et 41°.

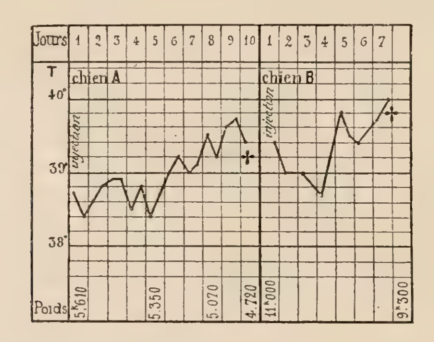
Kanthack, Durham et Blandford ont tué des chiens en 14 à 26 jours (moyenne 18) ; la période d'incubation était de 4 à 6 jours.

Comme pour les souris, rats et cobayes, le virus s'est montré plus actif dans nos expériences. Deux de nos chiens ont succombé en 12 jours, un autre en 9 jours, un 4e en 6 jours 1/2 [1]. Les Trypanosomes ont apparu dans le sang (non seulement chez ces chiens, mais chez une dizaine d'autres qui nous ont servi à divers essais de traitement) 2 ou 3 jours après l'inocu-

1. Nocard (*Société de Biologie*, 4 mai 1901) a tué un chien neuf en 14 jours et deux chiens réfractaires à la *Dourine* en 11 jours.

lation (toujours sous-cutanée), une seule fois au bout de 4 jours seulement.

Depuis le jour de l'apparition dans le sang jusqu'à la mort, les Trypanosomes sont toujours décelables en plus ou moins grand nombre à l'examen microscopique. Chez nos 2 chiens qui n'ont résisté que 6 jours 1/2 et 9 jours, ils ont toujours été constamment en augmentant; chez les 2 autres qui ont résisté 12 jours, il y a eu, aux 8e et 9e jours, une diminution dans le nombre des parasites du sang, suivie d'augmentation. Les Trypanosomes sont toujours nombreux au moment de la mort (1 pour 10 à 50 hématies).



Tracés 1 et 2.

Les symptômes de la maladie sont généralement réduits à un œdème des organes génitaux avec hypertrophie considérable des ganglions de l'aine ; et encore ces manifestations peuvent faire défaut. Il y a quelquefois aussi œdème de la tête ; nous n'avons observé de lésions importantes des yeux ou du nez qu'une fois : il y avait trouble de l'humeur aqueuse. On peut noter aussi une parésie légère et fugace du train postérieur.

Nous donnons ci-contre les tracés de température chez 2 de nos chiens. On remarquera que la courbe s'élève du 3e au 5e jour pour se maintenir au voisinage de 40° jusqu'à la mort. Chez d'autres chiens, nous avons noté des poussées à 40°,5. Malgré la marche rapide de l'infection, l'animal baisse de poids dans des proportions assez fortes (voir le tableau).

Nous n'avons pas expérimenté sur des chats. L'évolution de la maladie ne doit guère différer de ce qu'elle est chez le chien,

si l'on s'en rapporte aux données des auteurs anglais : mort en 22 à 26 jours ; période d'incubation, 5 jours.

E. *Singes.* — On a encore peu de données sur la marche du Nagana chez les singes. — Kanthack, Durham et Blandford ont expérimenté sur un *Macacus rhesus :* il a survécu deux semaines à l'inoculation et est mort dans « un état avancé de tuberculose pulmonaire »; « la présence d'abondants hématozoaires a été constatée dans le sang durant la vie jusqu'au moment de la mort. »

Nocard (*l. c.*) a opéré sur « un vieux macaque, vigoureux et très méchant, qui reçoit sous la peau de la queue quelques gouttes de sang de souris; quatre jours après, il est triste, refuse de manger, se laisse manipuler sans résistance. Sa température approche de 41°; son sang renferme une énorme quantité de Trypanosomes ». Ce singe, d'après les renseignements inédits que M. Nocard a bien voulu nous communiquer, est mort 15 jours après l'inoculation après avoir montré de la fièvre, de l'œdème des paupières et des bourses, et de très nombreux parasites dans le sang à partir du 5e jour. Au moment de la mort, il y avait plus d'hématozoaires que de globules.

F. *Équidés.* — Bruce donne de nombreux détails sur l'évolution du Nagana chez les Équidés (cheval et âne).

« Chez un cheval atteint de Nagana, on est d'abord frappé, dit-il, par l'aspect particulier de son poil (*the coat stares*) et l'écoulement aqueux des yeux et du nez. Peu après, il y a enflure de la région abdominale ou gonflement du fourreau et l'état général de l'animal devient mauvais. Les membres postérieurs ont une tendance générale à enfler; mais ces diverses enflures sont variables d'un jour à l'autre, étant plus ou moins marquées ou même disparaissant complètement. Pendant ce temps, l'animal maigrit de plus en plus; il a l'air hébété, sa tête pend, son poil devient rugueux et rare par places. Les muqueuses des yeux et des gencives sont pâles et, généralement, on observe un aspect légèrement laiteux de la cornée. Dans les cas graves et aux dernières périodes de la maladie, un cheval présente une apparence misérable. Il est devenu un véritable épouvantail, couvert de poils rudes et rugueux, absents par places. Les membres postérieurs et le fourreau sont plus ou moins enflés, quelquefois considérablement; il a pu même

devenir tout à fait aveugle. A la fin, il tombe à terre sans pouvoir se relever; sa respiration devient de plus en plus courte et il meurt d'épuisement. Pendant sa maladie, il n'a pas paru souffrir et, jusqu'au dernier jour, son appétit a été bon. »

L'histoire détaillée de deux chevaux naganés complète cette description. Aux premiers symptômes de la maladie, il y a apparition des Trypanosomes dans le sang, et fièvre. Cette fièvre se maintient jusqu'à la mort; c'est une fièvre rémittente ou intermittente; les poussées peuvent aller à près de 42°. L'un des chevaux (préalablement faible et en mauvais état) meurt après 16 jours de maladie, l'autre après 43 jours. Les Trypanosomes sont décelables tous les jours à l'examen microscopique (à 1 ou 2 exceptions près); les hématies diminuent graduellement, et à la mort, sont réduites à la moitié du nombre primitif, ou même moins.

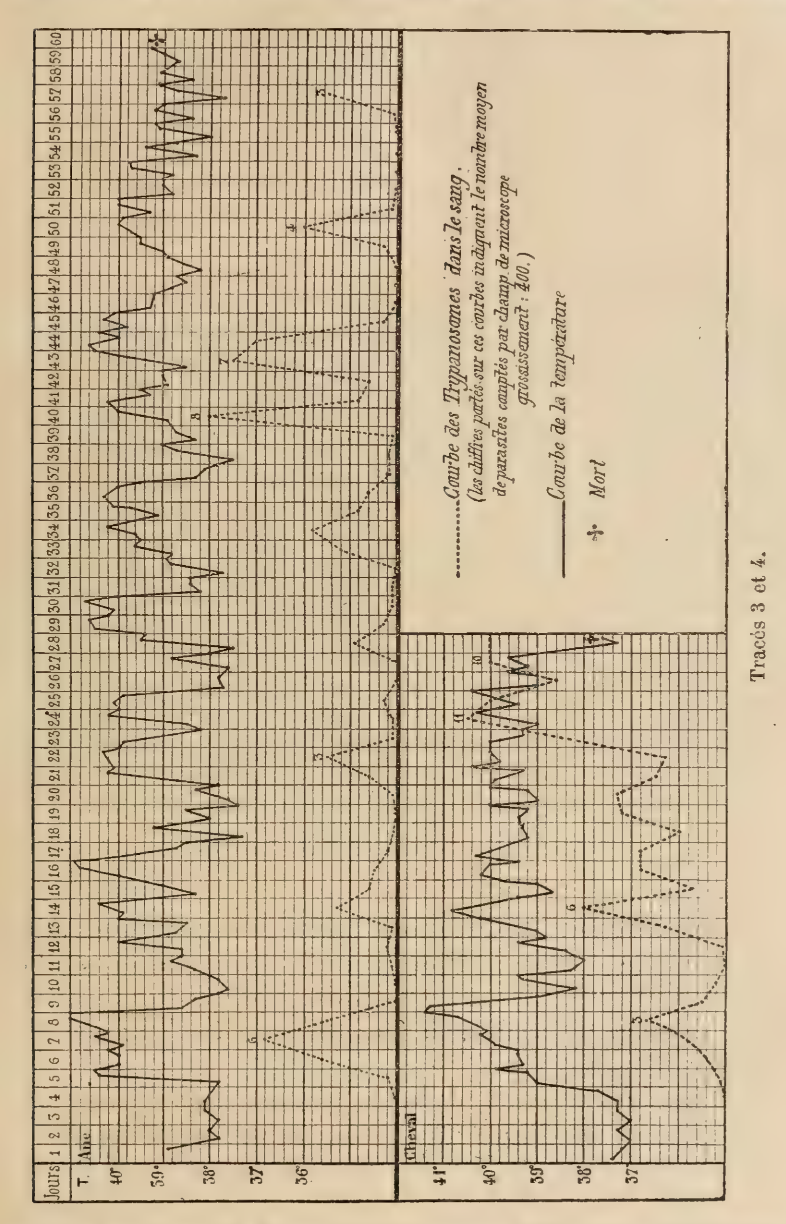
Les ânes présentent les mêmes symptômes et meurent après 15 jours environ de maladie.

Kanthack, Durham et Blandford ont inoculé deux chevaux : l'un est mort 8 jours, l'autre 49 jours après. Deux hybrides de cheval et de zèbre et 1 hybride d'âne et de zèbre ont succombé en 8 semaines; enfin, un âne a été sacrifié mourant 84 jours après l'inoculation. Ces savants ont confirmé les constatations de Bruce relatives aux paroxysmes de fièvre, à la coïncidence de la première poussée de température avec l'apparition des Trypanosomes dans le sang, etc.

Nous avons expérimenté avec un cheval (vieux) et une jeune ânesse de deux ans. Le cheval a succombé en 27 jours, l'âne en 59 jours. Nous donnons ci-contre la marche de la température chez les deux animaux, et au-dessous une courbe qui donne une idée approximative de la quantité relative de Trypanosomes présents dans le sang. Nous nous contenterons d'ajouter quelques remarques.

Dans les deux cas, l'inoculation a été faite sous la peau de l'encolure; l'âne a montré un œdème très passager au point d'inoculation; chez le cheval, il a duré plus longtemps et est descendu jusqu'au poitrail. Chez les deux animaux, les Trypanosomes ont apparu dans le sang moins de 4 jours après l'injection. Leur apparition dans la circulation a coïncidé avec une brusque élévation de température qui, en quelques jours,

est montée à 41°,4 chez le cheval, à 41° chez l'âne. Cette forte



Tracés 3 et 4.

poussée a été suivie d'une chute brusque à 38° et en même temps d'une diminution tellement grande des Trypanosomes dans le

sang que nous n'en avons plus vu à l'examen microscopique. La température est ensuite remontée au-delà de 40° chez les deux animaux et les Trypanosomes ont reparu dans le sang.

A partir de ce moment, la marche de la température chez le cheval a été celle d'une fièvre rémittente, oscillant entre 39 et 40°,5. Il n'y a eu baisse (à 37°,5) que le jour de la mort. On remarquera un certain parallélisme entre les poussées de fièvre et l'augmentation du nombre des Trypanosomes dans



Cheval le 24e jour après l'inoculation.

le sang; mais les derniers jours, le nombre des Trypanosomes augmente hors de proportions avec la fièvre. Jamais, sauf un jour (le 10e) nous n'avons manqué de trouver des Trypanosomes dans le sang. L'anémie était assez prononcée au moment de la mort.

Chez l'âne, la marche de la température est plus irrégulière. On a encore une fièvre rémittente, mais avec intermittences nettes, espacées assez régulièrement (tous les 6 ou 7 jours en moyenne). On constate, avec beaucoup plus de netteté que chez le cheval, que la courbe des Trypanosomes suit une marche parallèle à celle de la température. Les parasites sont en général

plus rares que chez le cheval; souvent, malgré un examen prolongé, nous n'en découvrions que 2 ou 3 dans une préparation, et quelquefois pas du tout. On sera sans doute frappé de cette rareté des Trypanosomes dans les 10 derniers jours de la vie de l'animal; il était alors soumis à un traitement arsenical, malheureusement trop tardif. Dans les 5 dernières semaines, il y a eu anémie assez marquée.

Les symptômes locaux (œdèmes, etc.) ont été peu accusés chez le cheval, à peu près nuls chez l'âne. Environ 15 jours après l'inoculation, le cheval a montré de l'œdème du fourreau qui s'est étendu peu à peu sous forme de deux traînées longitudinales jusqu'à la région thoracique. Les deux traînées se sont alors rejointes sur la ligne médiane et ont constitué, sur toute la région ventrale, une large plaque œdémateuse qui a persisté jusqu'à la mort (elle apparaît nettement sur la reproduction photographique ci-jointe). Nous n'avons jamais noté d'œdème de la tête, des membres, de lésions de l'œil, etc.

L'appétit, sauf dans les périodes de forte fièvre, a toujours été bon; il n'y a eu aucun amaigrissement, aucune baisse de poids sérieuse.

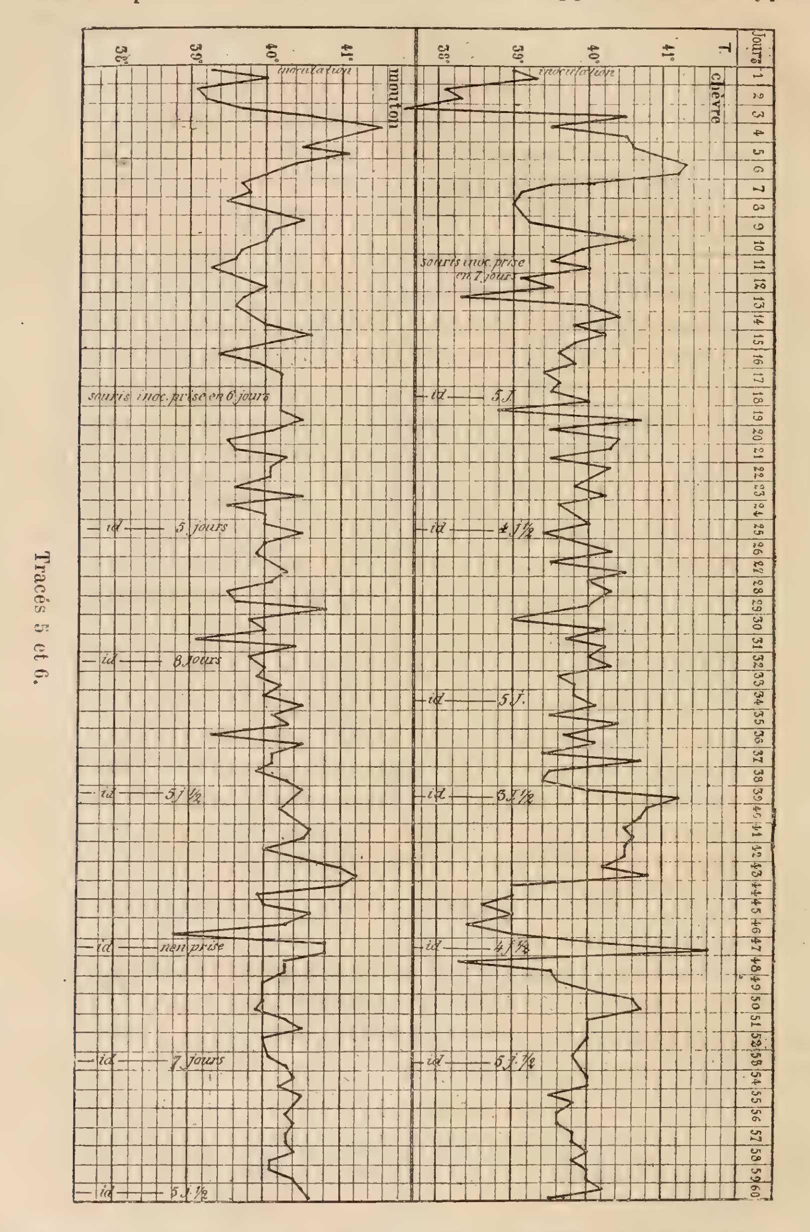
L'âne n'a pas présenté d'œdèmes appréciables. Son poids qui, au début, était de 172 kilos, n'a baissé que dans les 10 derniers jours; il était tombé, 3 jours avant la mort, à 140 kilos. Vers la 6e semaine, l'animal a présenté un aspect lamentable. Paraissant insensible à toutes les manifestations extérieures, toujours la tête basse, l'œil terne, il restait souvent des heures immobile à la place où on l'avait conduit. Nul animal n'a mieux répondu au sens du mot *nagana*. Les derniers jours, il montrait un peu de parésie.

G. *Chèvre et mouton.* — « D'après des observations inédites de Bruce sur la maladie de la mouche tsétsé dans l'Afrique australe, il apparaît que les chèvres et les moutons indigènes sont jusqu'à un certain degré réfractaires, la maladie, en règle, affectant une marche chronique (5 mois) [1]. » Ce sont les seuls renseignements que nous possédions. Nous avons inoculé une chèvre et un mouton le 25 octobre dernier. Ils sont encore vivants.

Au point de vue des débuts de la maladie, ces animaux se

1. Kanthack, Durham et Blandford, *l. c.*, p. 102.

sont comportés comme l'âne et le cheval : apparition des Trypa-



Tracés 5 et 6.

nosomes dans le sang en 3 jours, poussée de température jusqu'au delà de 41° (voir les courbes ci-contre). Mais les para-

sites deviennent ensuite si rares dans le sang qu'il ne nous est plus jamais arrivé d'en observer au microscope. Ce sang est toujours virulent : les souris inoculées sous la peau avec quelques gouttes de ce sang contractent le Nagana; la durée d'incubation varie de 4 jours 1/2 à 8 jours et donne une idée de la quantité (toujours très faible) des parasites du sang. Généralement, les souris inoculées avec le sang de la chèvre sont prises plus vite que celles inoculées avec le sang du mouton.

La température se maintient au voisinage de 40°, avec de rares poussées au-delà de 41, et de rares intermittences.

M. Nocard a bien voulu nous donner la marche complète de la maladie chez un mouton qui a succombé en 6 mois 1/2 (exactement 197 jours). Il a montré, le 6e jour après son inoculation, une poussée au-dessus de 41°, puis la température est revenue entre 39 et 40°; le 24e jour, nouvelle poussée à 41°,5; cette fois la température se maintient longtemps au voisinage de 41°, et met une trentaine de jours à revenir à 40°; des œdèmes multiples apparaissent à la face et aux yeux, puis aux testicules. C'est seulement durant cette période que des Trypanosomes ont pu être observés à l'examen microscopique; pendant une huitaine de jours, il y en a même eu plusieurs par champ de microscope. Les œdèmes ont encore augmenté, se sont étendus à la croupe, à l'épaule (fin du 3e mois). Leur disparition a été rapide; l'animal (4e, 5e et 1re moitié du 6e mois) paraît guéri (la température est entre 39 et 40°); pourtant son sang est encore virulent. Le dernier mois, il maigrit rapidement, et il meurt avec lésions de cachexie profonde, exsudat gélatineux de la gorge, du péricarde et des plèvres.

H. *Bovidés*. — Nous n'avons pas d'observations personnelles. « Il y a, dit Bruce, de grandes variations dans la durée de la maladie chez les bovidés; une petite proportion meurent dans la semaine qui suit le début de la maladie, beaucoup dans le mois, et d'autres traînent pendant 6 mois et même plus. L'opinion générale parmi les marchands et les indigènes du Zoulouland, est qu'il y a un très faible pourcentage de guérisons.

« Les symptômes généraux, chez les bovidés, sont beaucoup moins marqués que chez les chevaux ou les chiens. Ils maigrissent graduellement. Les poils, au début rugueux, ont tendance

à tomber. Il y a écoulement de liquide aqueux des yeux et du nez et une tendance à la diarrhée toujours légère. Dans beaucoup de cas, les fanons deviennent enflés et pendants, mais je n'ai jamais trouvé la même tendance à l'enflure de la partie abdominale ni des membres postérieurs que chez les autres animaux, de même que je n'ai jamais constaté la cécité. Les hématozoaires sont également beaucoup moins nombreux et il faut souvent les chercher plusieurs jours de suite avant de pouvoir les observer. »

La fièvre, continue, est moins accentuée que chez le cheval, surtout étant donnée la température normale plus élevée du bœuf (voisine de 39°); il y a quelques poussées au delà de 41°.

Une vache bretonne, inoculée sous la peau le 30 octobre dernier par M. Nocard, montre une poussée brusque de température au-dessus de 41°, le 4 novembre; le sang renferme de rares parasites. Le 5, la température est normale et elle est restée normale depuis. Depuis, également, il a été impossible de voir un seul Trypanosome dans son sang. Mais le 26 décembre, son sang était virulent pour la souris. La marche de la maladie est tout à fait chronique.

Anatomie pathologique. — Le Nagana est certainement une des maladies où, à l'autopsie des animaux morts, on trouve le moins de lésions. Presque tous les auteurs ne donnent, comme lésion constante, que l'hypertrophie de la rate. Elle est, en effet, constante chez les rats et les souris[1], mais elle ne l'est pas, d'après nos observations, chez les cobayes et les lapins[2]; elle serait générale, d'après Bruce, pour les grands animaux domestiques. Chez le rat, elle consiste surtout en une congestion de l'organe, sans changements histologiques appréciables à l'examen microscopique des coupes.

Sur les frottis de rate et de foie, les nombreux parasites de ces organes apparaissent souvent déformés (si l'autopsie n'a pas été faite *immédiatement* après la mort). Les parasites sont souvent

1. La rate d'une souris normale est environ le 300e du poids (7 centigrammes pour une souris de 20 grammes); celle d'une souris morte de Nagana est le 100e du poids. Elle triple donc.

La rate d'un rat nagané est assez variable de poids; il y en a qui triplent, d'autres qui décuplent de poids.

2. De deux cobayes, de 290 grammes chacun, ayant résisté respectivement 26 et 21 jours à l'infection, la rate du premier pesait 0 gr. 50, celle du second 1 gr. 90.

groupés, ce qui pourrait faire croire à des formes particulières de multiplication.

Kanthack, Durham et Blandford, d'une part, Plimmer et Bradford, de l'autre, ont insisté sur l'hypertrophie des ganglions lymphatiques, surtout de ceux correspondant à l'endroit d'inoculation. Cette hypertrophie est, en effet, réelle; mais, contrairement à l'avis des deux derniers auteurs cités, elle ne nous a pas paru être en rapport avec une multiplication considérable des parasites qui sont plutôt rares dans ces organes.

Chez le rat dératé mort de Nagana, les ganglions du côté inoculé étaient très développés, mais guère plus que ceux correspondants du rat nagané témoin.

D'après les auteurs, les animaux qui s'infectent en mangeant des matières virulentes présentent toujours des ganglions hypertrophiés dans la région de la tête ou du cou, preuve, disent-ils, que l'infection a eu pour porte d'entrée une écorchure de la bouche ou des naseaux. Nous n'avons pas d'observations personnelles.

A l'autopsie de notre cheval, qui a pu être faite 11 heures après la mort, les lésions des organes internes ont été insignifiantes. La rate ne paraissait pas hypertrophiée (P. = 3 kgr. 150), mais sa surface était mamelonnée et couverte de marbrures brun foncé. Nous avons recueilli 300 c. c. de liquide pleural rosé et 150 c. c. de liquide péricardique, l'un et l'autre renfermaient peu de Trypanosomes. Il y avait quelques ecchymoses sous-péricardiques et sous-endocardiques ; rien au myocarde. Tous les autres organes étaient normaux.

Nous avons cité à leur place les lésions externes des lapins et des cobayes; nous n'y revenons pas.

Enfin, il convient de remarquer que, dès que l'animal nagané meurt et même déjà parfois pendant l'agonie, les Trypanosomes qu'il renferme diminuent de vitalité. 24 heures après la mort, surtout chez les petits animaux, il n'y a plus de parasites mobiles dans le sang ou les organes, ou bien ces parasites sont en très petit nombre : le sang est parfois encore virulent.

Pathogénie des Accidents. — Comment agit le Trypanosome du Nagana? Évidemment, en présence d'une infection aussi intense que celle qui se présente au moment de la mort des rats, des souris et de certains autres animaux, on songe à une action

mécanique d'un tel nombre de parasites[1]. Mais il nous semble qu'elle ne peut suffire, à elle seule, à expliquer la mort. D'abord, les rats infectés par le *Trypanosoma Lewisi* peuvent avoir une aussi grande quantité de parasites dans leur sang et n'en paraître guère incommodés; d'autre part, dans certains essais de traitement dont nous parlerons ultérieurement, un rat a vécu plus de 15 jours avec, dans son sang, presque autant de Trypanosomes du Nagana que d'hématies.

Chez les animaux qui résistent un certain temps à la maladie, il y a anémie manifeste; mais elle n'est jamais assez marquée pour expliquer à elle seule la mort.

On est donc amené à songer à une action toxique des parasites, à une intervention de produits solubles excrétés par eux. Et l'observation de la marche de l'infection chez les lapins, les cobayes, les bovidés, où les parasites sont si rares dans le sang, souvent même au moment de la mort, l'aspect d'hébétude profonde de certains animaux naganés, tel l'âne dont nous avons tracé l'histoire, corroborent pleinement cette manière de voir.

Nous avons donc cherché à mettre en évidence cette toxine des Trypanosomes. Pour séparer les parasites des hématies, nous avons utilisé une remarque de Kanthack, Durham et Blandford qui recommandent de centrifuger le sang quand les parasites y sont rares ; les hématozoaires se réunissent à la partie supérieure du dépôt de globules rouges. Quand on saigne un rat ayant au moins autant de Trypanosomes dans le sang que d'hématies, qu'on mélange le sang avec deux fois son volume d'eau physiologique citratée et qu'on centrifuge, on a, au-dessus de la couche d'hématies, une couche de hauteur égale à 1/4 ou à 1/2 de la première, d'un blanc laiteux, formée à peu près uniquement de Trypanosomes. Nous avons soumis cette couche à plusieurs procédés pour en extraire les produits solubles.

1° Procédé de congélation (à — 15°) et de décongélation brusque (à 40°) successives. Malgré 5 ou 6 passages de — 15° à 40°. les Trypanosomes sont encore en partie vivants. Cette émulsion, inoculée le jour même, à la dose de 0 c. c. 2, dans le cerveau de 2 rats et de 2 c. c. 5 sous la peau d'un 3me, a

1. Il est possible que les phénomènes convulsifs notés chez les rats, soient dus à des embolies des vaisseaux du bulbe, causées par les parasites.

tué les 3 rats *d'infection :* les 2 premiers avec des périodes d'incubation de 7 et 5 jours, le 3me de 11 jours.

Une semblable émulsion, laissée 36 heures à la glacière, ne renferme plus de Trypanosomes vivants. Celle obtenue avec les Trypanosomes d'un rat a été injectée dans le cerveau de 2 rats et de 2 cobayes. Les 2 cobayes et 1 rat ont survécu; l'autre rat (qui n'avait reçu que le quart de la dose du 1er) est mort en 3 h. 1/2. Pendant la dernière heure, alors qu'il paraissait remis de l'opération, il a été pris d'attaques convulsives, avec raideur, mouvements cloniques et toniques; à l'autopsie, on a constaté une hypérémie très marquée des méninges; l'inoculation avait pénétré dans le ventricule gauche et n'avait été suivie d'aucune hémorragie.

2° Procédé par dessiccation. — L'émulsion des Trypanosomes extraits d'un rat est desséchée rapidement dans le vide. La poudre est reprise par l'eau. Un rat inoculé dans le cerveau avee cet extrait n'a montré aucun symptôme de maladie.

3° Nous avons essayé d'utiliser l'action de la température de 42° sur les Trypanosomes. — Des émulsions soumises 16 heures à cette température et inoculées sous la peau de rats et de souris n'ont amené aucun trouble chez ces animaux.

Notons enfin, pour être complets, que des sacs de collodion remplis de sang à Trypanosomes, placés dans le péritoine de deux cobayes, n'ont produit, chez eux, aucun phénomène d'intoxication. L'un des sacs, retiré 5 jours après son introduction, ne contenait plus de Trypanosomes vivant.

Kanthack, Durham et Blandford ont fait, comme nous, des efforts vains pour mettre en évidence une toxine des Trypanosomes.

V

LES DIVERSES ÉPIZOOTIES A TRYPANOSOMES. LEURS RESSEMBLANCES ET LEURS DIFFÉRENCES [1].

L'Afrique n'a pas le triste privilège des maladies à Trypanosomes. Les autres parties du monde, surtout dans les régions chaudes, ont aussi de pareilles épizooties.

1. Nous adressons nos remerciements à M. le professeur Railliet, qui nous a fourni de nombreux renseignements bibliographiques sur ces diverses épizooties.

I. SURRA. — La première connue est le *Surra* de l'Inde. En 1880, Griffith Evans [1] découvrit, dans le sang des chevaux, mulets et chameaux atteints de cette maladie, la présence d'un organisme filiforme, très mobile, qu'il prit d'abord pour un spirille, mais dont il reconnut vite, avec Lewis qui venait de découvrir le flagellé du sang des rats, la nature animale.

J. H. Steel [2], en 1885, trouva le même organisme dans le sang des mules de transport, en Birmanie anglaise. Il le rapprocha du parasite de la fièvre récurrente de l'homme et le nomma *Spirochaete Evansi*.

Ce fut Crookshank [3] qui, à Londres, grâce à l'examen de préparations de sang de chameaux, qu'Evans lui avait fait parvenir, mit en évidence les principaux caractères de l'hématozoaire (membrane ondulante, flagellum, etc.).

Malheureusement, les auteurs qui, depuis lors, ont traité du Surra, n'ont pas donné de nouveaux détails sur le parasite que tout le monde désigne sous le nom de *Trypanosoma Evansi* (Steel).

Lingard, dans une série de volumineux mémoires [4], a donné de nombreux détails sur cette maladie et son extension dans l'Inde et les pays limitrophes. Elle sévit dans les provinces N.-O. de l'Inde, dans le Punjab, l'Assam, la présidence de Bombay, etc.; — dans la Birmanie anglaise; — dans les provinces chinoises de Shan; — dans la Perse (Haig, cité par Lingard); — sur les bords du golfe Persique (chevaux malades importés à Bombay); — au Tonkin (d'après le vétérinaire

1. G. EVANS, *Report on Surra*, published by the Punjab Government, Military department, 3 déc. 1880 (cité d'après Crookshank et Lingard).

2. J.-H. STEEL, *Report on his investigations with an obscure and fatal disease among transport mules in British Burmah*, 1885 (cité d'après Crookshank et Lingard).

3. CROOKSHANK, Flagellated Protozoa in the Blood of diseased and apparently healthy animals (*Journal of the R. microsc. Soc.*, déc. 1886, p. 913, pl. 17).

Crookshank rapprocha le parasite du Surra des *Haematomonas* (flagellés du sang des poissons) de Mitrophanow; il eut seulement le tort de faire rentrer le genre *Haematomonas;* dans un autre genre de Flagellés, *Trichomonas*. Osler (*British med. Journ.*, 12 mars 1887) fit revivre le genre *Haematomonas*; enfin, Balbiani (*Journal de Micrographie*, 1888, p. 399) adopta l'ancien nom générique de Gruby, *Trypanosoma*.

4. ALFRED LINGARD, *Report on Horse Surra*, vol. I, Bombay, 1893. — *Summary of further report on Surra*, Bombay, 1894. — *Idem*, 1895. — *Annual report of the imperial bacteriologist* for the official year 1895-1896. — *Report on Surra in Equines, Buffaloes and Canines*, etc., vol. II, Bombay, 1899.

français Blanchard [1]); — peut-être en Corée (W.-G. Campbell, cité par Lingard). — C'est sans doute la même maladie que Carrougeau [2] a observée récemment sur des chevaux de l'Institut Pasteur de Nha-Trang (Annam) employés à la préparation du sérum antipesteux. Elle sévit aussi aux Indes néerlandaises [3].

Comparons les deux maladies *Surra* et *Nagana*. La question de l'identité s'est posée le jour où Bruce a démontré que le *Nagana* était produit par un hématozoaire extrêmement voisin du *Tr. Evansi*, sinon identique. Koch (*l. c.*) qui a vu le Surra et son parasite au laboratoire de Lingard, qui a ensuite étudié le Nagana dans l'Afrique orientale allemande, conclut à l'identité. C'est aussi l'avis de Nocard [4] et de L. Rogers [5].

On ne peut tirer aucun argument d'une comparaison morphologique des deux parasites, car la structure de celui du Surra est encore trop insuffisamment connue.

Examinons la marche des deux maladies. Les mêmes animaux sont sensibles aux deux maladies : les chevaux, les ânes (sauf peut-être certaines races), les mulets, les chèvres (aux Indes néerlandaises, elles seraient réfractaires au Surra), les moutons, les bœufs, les chameaux, les chiens, les chats, les singes macaques [6], les lapins, les cobayes, les rats [7].

1. Mollereau, Maladies des mulets au Tonkin, rapport sur un travail de M. Blanchard, *Bull. Soc. centrale médecine vétérinaire*, 30 déc. 1888, p. 694.

2. Carrougeau, Note relative à l'existence du trypanosome en Indo-Chine. *Bull. Soc. centr. médecine vétérinaire*, 8e série, tome VIII, 30 juin 1901, p. 295.

3. C. A. Penning, *Veeartseniikundige Blade vor Nederl. Indië*, VIII, 1900 (analyse in *Centr. f. Bakt.*, t. XXVIII, p. 613). — J.-K.-F. De Does, Les maladies à Trypanosomes à Java. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederl-Indië*, XLI, 1901, p. 138. — Nous n'avons malheureusement pas pu consulter ces deux publications.

4. Nocard, *Bull. Acad. de médecine*, 31 juillet 1900, p. 154. — Sur les rapports qui existent entre la *dourine* et le *surra* et le *nagana*, *C. R. Soc. Biologie*, 4 mai 1901, p. 464.

5. Léonard Rogers, The transmission of the *Trypanosoma Evansi* by the Horse Flies and other experiments pointing to the probable Identity of Surra of India and Nagana or Tse-tse fly disease of Africa, *Proceed. of the R. Society*, LXVIII, p. 163, 4 mai 1901.

6. C'est Steel qui a reconnu la sensibilité du macaque au Surra ; le fait a été confirmé par Lingard et tout récemment par Carrougeau. Le Surra des Indes Néerlandaises tue également les singes.

7. Le Surra tue les buffles de l'Inde (durée de la maladie, 125 et 51 jours dans deux expériences de Lingard) et des Indes néerlandaises (Penning). Les buffles du Zoulouland renferment le parasite du Nagana dans leur sang (expérience de Bruce) ; y succombent-ils? nous n'avons aucune donnée précise à cet égard.
L'éléphant de l'Inde serait sensible au Surra (G.-H. Evans, cité par Lingard).

Chez le cheval, la marche de la maladie est la même, qu'il soit atteint de Surra ou de Nagana. L'animal meurt au bout du même temps (une trentaine de jours en moyenne). Dans les cas d'inoculation expérimentale, la période d'incubation est la même; on a mêmes œdèmes, mêmes lésions de l'œil et des paupières, même degré d'anémie, même émaciation, suivie des parésies finales, précédant la mort qui est fatale. La fièvre offre le même caractère, sauf peut-être qu'elle est d'un type plus nettement intermittent dans le cas du Surra; de plus, durant ces intermittences, qui peuvent aller de 1 à 6 jours, les parasites ne sont plus décelables à l'examen microscopique du sang, alors qu'ils manquent très rarement dans le Nagana (Lingard insiste particulièrement sur cette différence). En somme, les différences sont minimes.

Les autre équidés, la chèvre, le mouton, le chien succombent aux deux maladies au bout des mêmes laps de temps et avec sensiblement les mêmes symptômes. Chez le dromadaire, le Nagana évolue assez rapidement; chez le chameau d'Asie, le Surra est tantôt à marche assez rapide, tantôt à marche très lente, pouvant même durer trois années (d'où le nom *tei-barsa*, qui veut dire *trois ans*, donné à la maladie des chameaux dans certains districts de l'Inde).

Les lapins, les cobayes, les rats (*Mus decumanus*)[1] succombent au Surra à peu près dans les mêmes conditions qu'au Nagana.

Restent les bovidés. Peu survivent au Nagana, d'après Bruce, Koch et les explorateurs africains en général. En revanche, ils guérissent généralement du Surra. D'après Lingard, la mort, du fait de cette maladie, serait tout à fait exceptionnelle. L'animal maigrit beaucoup, mais revient à la santé; une deuxième inoculation est supportée presque sans dommage. Il paraît y avoir là une différence très nette entre les deux maladies. Peut-être tient-elle à une différences de races, comme Rogers en fait la supposition, s'appuyant sur les expériences de Koch relatives

Mais les renseignements que donne Lingard manquent de précision; dans sa liste des animaux succombant au Surra, l'éléphant figure suivi d'un point d'interrogation (*Annual report* for 1895-96, p. 8). Lingard semble pourtant bien avoir vu des Trypanosomes du sang de l'éléphant, d'après une autre phrase de ce rapport (même page).

1. Le rat musqué de l'Inde (*Nesokia providens*) est également très sensible.

aux ânes de Massaï. En tout cas, la question doit être tranchée par la méthode expérimentale. Si la supposition de Rogers est reconnue inexacte, il sera indiqué de rechercher si les bœufs, inoculés à plusieurs reprises avec le virus du Surra, sont sensibles au Nagana. C'est seulement quand ces expériences auront été faites qu'on aura le droit de conclure d'une façon catégorique.

L'étiologie du Surra est encore bien mal élucidée. Depuis de longues années, les indigènes de divers districts de l'Inde incriminent des mouches qu'ils appellent *Burra Dhang* (*Tabanus tropicus* et *T. lineola*) d'être les propagatrices de la maladie. Griffith Évans, après sa découverte du parasite, considère également comme possible l'inoculation de la maladie à un animal sain par ces taons venant de piquer un animal malade. En 1888, Kay Lees (cité par Lingard), étudiant la maladie dans les Naga-Hills, au nord-est de l'Assam, incrimine la mouche tsétsé. Dans son premier mémoire, Lingard parle aussi du rôle possible des mouches; mais il abandonne bientôt cette idée pour chercher à mettre en évidence le rôle de l'eau, des herbes des terrains arrosés, des grains souillés par les excréments des rats[1]. Dans son dernier rapport, rédigé à la suite des découvertes de Bruce, il revient au rôle des mouches, mais sans rien abandonner de ses autres conceptions. La question n'est entrée dans la phase expérimentale que l'an dernier, où Rogers a démontré, par des expériences tout à fait probantes, que les taons asiatiques pouvaient jouer un rôle identique à celui de la tsétsé en Afrique. Il est bien probable que de nouvelles recherches confirmeront les expériences de Rogers et prouveront que les diptères jouent un rôle capital dans l'étiologie du Surra. Quant au rôle rempli par le gibier sauvage en Afrique, il le serait, dans l'Inde, par les bovidés (Rogers).

II. Mal de caderas. — Passons maintenant à une autre maladie, le *Mal de caderas* (maladie de la croupe) qui sévit sur les équidés, dans la région du Chacco, au centre de l'Amérique du Sud (ce vaste territoire est partagé entre la Bolivie, le Para-

1. Lingard croit à l'identité du *Trypanosoma Lewisi* et du *Tr. Evansi*. Cette idée, tout à fait invraisemblable a priori, a été démontrée fausse par Rogers. Quand Lingard inoculait le *Tr. Lewisi* aux chevaux et aux autres animaux sensibles au Surra, il ne se mettait pas à l'abri de l'intervention des mouches.

guay et la République Argentine), et probablement aussi au Brésil dans le territoire de Matto-Grosso. Il y a quelques mois, un ancien élève de l'Institut Pasteur, le docteur Elmassian, directeur de l'Institut bactériologique de l'Assomption [1], a reconnu que cette maladie est encore due à un Trypanosome qui, d'après les préparations de M. Elmassian, qui nous ont été confiées par le docteur Morax, ne paraît pas différer morphologiquement du Nagana.

La découverte d'Elmassian a été rapidement confirmée dans le laboratoire de Voges, à Buenos-Aires [2].

La maladie naturelle sévit chez les équidés; par sa durée, par ses divers symptômes (fièvre, anémie, œdèmes, amaigrissement, faiblesse musculaire), elle ne diffère guère du Surra et du Nagana; il y a à noter en plus la présence fréquente d'hématurie. La parésie du train postérieur, souvent plus marquée à un membre qu'à l'autre, qui est le phénomène le plus frappant de la maladie sud-américaine et qui lui a valu son nom (maladie de la croupe) est sans doute plus accusée que dans le Surra et le Nagana.

Elmassian a reconnu la grande sensibilité du singe (*Nyctipithecus felinus*). Zabala, Malbran et Voges ont étudié la réceptivité de divers animaux : le chien, le mouton, la chèvre, le chat, le singe, le lapin, le cobaye, le rat et la souris succombent au bout de temps variables suivant l'espèce animale (5 à 12 jours pour le rat, 4 à 8 pour la souris, 10 à 15 jours pour le singe, 3 mois et plus pour la chèvre et le mouton). Chez le lapin, la marche est lente et l'animal présente aux yeux et aux organes génitaux les mêmes symptômes que nous avons notés pour le Nagana.

Les bovidés seraient absolument réfractaires; les savants argentins citent un taureau qu'ils inoculent, tous les 8 jours, depuis 1 an et 1/2, avec 200 à 300 c. c. de sang de cheval malade, et qui n'a présenté aucune trace de maladie. Ils ne disent pas si l'examen du sang du bœuf a été fait, son inocula-

1. Elmassian. — Mal de caderas. Conférence faite au conseil national d'hygiène le 19 mai 1901. Asuncion, 1901.

2. Joaquin Zabala (en collaboration avec C. Malbran et O. Voges). Mal de caderas. *Anales d. Departamento nacional de Higiene*. Buenos-Aires, ano IX, nov. 1901, p. 49). — Voges, *Berl. Thierärztl. Woch.*, 3 oct. 1901, p. 597.

tion pratiquée à des animaux sensibles, surtout dans le mois qui a suivi la première injection.

Au point de vue de l'étiologie, les auteurs cités sont réduits à des suppositions.

En résumé, la maladie de la croupe est évidemment très voisine du Nagana et du Surra.

III. Dourine. — Il nous reste à examiner une dernière maladie où l'agent pathogène est un Trypanosome. C'est la *Dourine* ou *Mal du coït* qui sévit sur les équidés reproducteurs. D'après Nocard et Leclainche [1], la Dourine existe sûrement en Hongrie, en Espagne et en Turquie, au Maroc, dans la régence de Tripoli, en Algérie, en Syrie, au Chili, probablement aux États-Unis.

Il est probable que le Trypanosome de cette maladie a été vu pour la première fois par Chauvrat [2] en 1892; le cheval parasité, atteint d'une anémie intense, était à la période tout à fait ultime de la maladie, et Chauvrat ne put en reconnaître la nature; il pensa à un cas de Surra.

Rouget [3] retrouva un Trypanosome dans un cas avéré de Dourine, l'étudia, démontra la réceptivité de certaines espèces animales (chien, lapin, rat, souris), mais il perdit accidentellement son virus sans avoir pu, après ces divers passages, reproduire la maladie sur le cheval. Le rapport de causalité entre le Trypanosome et la maladie du coït n'a été établi qu'à la suite des travaux de Schneider et Buffard [4], confirmés par Nocard [5].

Nous avons déjà montré, dans des notes antérieures et nous y revenons dans le chapitre III du présent mémoire, que le Trypanosome de la Dourine présente quelques différences morphologiques avec celui du Nagana. Il y a déjà là un argument important en faveur de la non-identité des deux maladies.

Au premier abord, Nagana ou Surra et Dourine paraissent très dissemblables. L'étiologie est complètement différente. La contagion par le coït paraît le seul mode naturel de diffusion de la Dourine, car on ne connaît pas de cas de Dourine « spontanée »

1. Ed. Nocard et E. Leclainche, *Les maladies microbiennes des animaux*, 2e édition, Paris, 1898, p. 841-856.
2. Chauvrat, *Rec. médec. vétérinaire*, 8e série, t. III, n° 11, 15 juin 1896, p. 344.
3. Rouget, *Annales Institut Pasteur*, X, 25 déc. 1896, p. 716.
4. Schneider et Buffard, Communications diverses à l'Académie de médecine, 25 juillet, 19 septembre, 3 octobre 1899. — *Rec. médec. vétérinaire*, 8e série, t. VII, 15 février-15 avril, 1900, p. 82, 157, 220. — *Archives de parasitologie*, III, 1900, p. 124.
5. Nocard, *l. c.*

chez les chevaux hongres et les mulets. Les insectes, dans les pays à Dourine, ne jouent donc aucun rôle dans la propagation de la maladie; nous en verrons tout à l'heure les raisons probables; elles n'indiquent pas une différence tranchée entre les deux maladies.

Le Nagana peut-il se prendre par le coït? C'est assez peu probable, puisque les essais de contagion, en déposant le virus sur les muqueuses ne réussissent pas, quand il n'y a pas de plaies à vif. Néanmoins, des expériences de contagion par le coït méritent d'être faites, surtout en se servant du lapin.

Étudions l'évolution de la Dourine chez le cheval. Les premiers symptômes apparaissent 10 ou 20 jours après le coït infectant. Ils siègent d'emblée aux organes génitaux. Chez le mâle, il y a engorgement œdémateux du fourreau, puis de l'extrémité du pénis ; léger suintement muco-purulent de la muqueuse uréthrale qui est enflammée. Chez la femelle, engorgement des deux lèvres ou seulement d'une seule ; muqueuse vaginale enflammée sécrétant du muco-pus.

Puis, en même temps que les lésions des organes génitaux persistent et même s'accentuent, d'autres phénomènes se manifestent : œdèmes des membres et de la région abdominale, anémie progressive, amaigrissement constant en dépit du bon appétit conservé, faiblesse musculaire, surtout du train postérieur, souvent flexion brusque des boulets. Certains symptômes sont pour ainsi dire pathognomoniques : telles les plaques cutanées que l'on observe sur diverses parties du corps. Il n'y a guère de phénomènes fébriles; la température dépasse rarement 39° [1].

La maladie dure ainsi de longs mois (généralement de 4 à 10 mois) ; la marche n'a donc pas ce caractère aigu qu'elle revêt dans le Nagana ou le Surra. A la fin de la vie, on note quelquefois des troubles oculaires (conjonctivite, kératite ulcéreuse); la parésie s'accentue; on a des paraplégies très prononcées et même complètes et, à l'autopsie, on note des foyers de ramollissement de la moelle que l'on n'observe jamais dans le Nagana ou le Surra.

Le Trypanosome est toujours très rare dans le sang; aussi faut-il parfois inoculer 10 à 15 c. c. de sang pour provoquer la

1. Au début de certaines Dourines, il y a élévations thermiques allant à 40° et même au dessus.

maladie. On comprend donc que les insectes ne puissent guère servir de convoyeurs de la maladie, même s'il en existe de favorables dans les pays à Dourine, ce qui est à prouver. En revanche, dans la sérosité sanguinolente que l'on peut recueillir au niveau des œdèmes, et surtout des plaques cutanées et de la muqueuse uréthrale ou vaginale, le parasite est généralement présent et parfois même en assez grand nombre, principalement si les plaques ou les œdèmes sont récents.

Les symptômes communs au Nagana et à la Dourine sont donc frappants. Quant aux symptômes spéciaux à la Dourine (plaques cutanées, foyers de ramollissement de la moelle), ils ne sont pas constants (les plaques cutanées, par exemple, manquent généralement chez l'âne) et peuvent être considérés comme en rapport avec la lenteur de la marche de la maladie. On a d'autant plus le droit de le supposer que, dans les cas à marche subaiguë, ils font défaut. Enfin, Nocard « a pu tuer des chevaux en 4, 6 et 8 semaines, et la courbe de leur température était identique à celle qui caractérise le Surra ou le Nagana ».

Au point de vue des équidés, la Dourine se comporte donc comme un Nagana atténué. Examinons la sensibilité des autres mammifères. Le chien, le lapin, le rat, la souris se sont montrés sensibles, mais avec des exceptions ou des degrés qui indiquent des variations de virulence de l'agent de contage. Ainsi, dans ses expériences, Rouget tuait, à coup sûr, les souris blanches, en 5 à 10 jours, d'une infection généralisée rappelant tout à fait, par sa marche, l'infection naganique ; un certain nombre seulement de rats d'égout succombaient, d'autres guérissaient après avoir présenté une infection sanguine, d'autres paraissaient tout à fait réfractaires. Au début de leurs études, Buffard et Schneider reproduisaient les expériences de Rouget sur les rats et les souris ; mais Nocard qui a eu leur Trypanosome, après passage par le chien, a trouvé la souris et le rat presque absolument réfractaires, et n'a pu que fort difficilement créer une race à laquelle le rat fût sensible.

Chez le lapin et le chien, la marche de la maladie rappelle beaucoup celle de la Dourine du cheval ; la contagion peut se faire par le coït. Nous insisterons particulièrement sur les lésions des lapins dourinés, déjà bien décrites par les auteurs que nous avons cités. Elles rappellent de très près celles que nous avons

signalées chez les lapins naganés, et nous avons pu apprécier cette ressemblance d'autant mieux que nous avons eu simultanément des lapins dourinés et naganés. Mais, dans le cas du Nagana, l'animal ne survit jamais plus de deux mois à l'inoculation, tandis que le lapin douriné peut vivre plus de 6 mois porteur des lésions caractéristiques. En somme, ces études d'infection expérimentale n'établissent pas non plus une différence tranchée entre la Dourine et le Nagana.

Beaucoup d'animaux sensibles au Nagana sont réfractaires à la Dourine : les singes macaques (d'après Nocard), les cobayes (d'après Rouget), les chèvres, les moutons, les bovidés. Mais il convient de remarquer que tous ces mammifères, sauf peut-être les singes, sont moins sensibles que les autres au Nagana. Les bœufs sont peu sensibles au Surra et seraient même tout à fait réfractaires au Mal de caderas, deux épizooties dont nous avons montré les liens étroits avec la maladie de la tsétsé.

Enfin, une expérience récente de Nocard (*Soc. de Biologie*, 4 mai 1901) permet de se rendre compte que la distance entre la Dourine et le Nagana est plus grande que ne pouvaient le faire supposer toutes les considérations qui précèdent sur la marche de la maladie, et vient corroborer nos observations morphologiques. Des chiens, très bien vaccinés contre la Dourine, ont été inoculés avec une très petite quantité de sang d'une de nos souris, contenant de nombreux Trypanosomes du Nagana, en même temps qu'un témoin. Les deux chiens vaccinés ont succombé au Nagana en 11 jours, le chien témoin en 14 jours seulement.



En résumé, nous connaissons, à l'heure actuelle, quatre maladies sévissant dans les diverses parties du monde, même en Europe, et qui sont dues à des Trypanosomes. Si l'on songe aux progrès considérables de nos connaissances à cet égard dans les trois dernières années, on a le droit de supposer que la liste de ces maladies n'est pas close et qu'on découvrira de nouvelles contrées où elles sévissent.

Toutes ces épizooties, en dehors du fait qu'elles ont pour agent causal un Trypanosome, ont des caractères communs indéniables : anémie, presque toujours fièvre rémittente, œdèmes

des organes génitaux et des extrémités, lésions de l'œil et des paupières, amaigrissement graduel malgré la conservation de l'appétit, faiblesse musculaire, parésie surtout marquée au train postérieur, pouvant aller jusqu'à la paralysie complète, etc.

Il y a donc lieu d'espérer que les méthodes qui se montreront efficaces pour venir à bout de l'une d'elles, seront aussi efficaces vis-à-vis des autres.

ÉTUDES SUR LA PESTE BOVINE

Par MM. M. NICOLLE et ADIL-BEY

TROISIÈME MÉMOIRE

EXPÉRIENCES SUR LA FILTRATION DU VIRUS

Le virus pestique peut traverser les filtres, ainsi qu'il ressort de nos expériences déjà anciennes, consignées dans un pli déposé, en juillet 1899, à l'Académie des sciences. Depuis cette époque, nous avons fait un grand nombre de recherches et celles-ci ne sauraient laisser aucun doute. Il nous faut cependant expliquer pourquoi on ne réussit qu'inconstamment, et ceci nous amène à présenter quelques réflexions générales au sujet de la filtration.

Lorsqu'on pratique une filtration, le passage des germes (nous avons surtout en vue, bien entendu, les germes dits invisibles) est soumis à diverses influences. Les unes se rapportent à la bougie, les autres aux microbes, d'autres au milieu qui tient les microbes en suspension, les dernières enfin à la température du liquide et à la pression employée.

Facteur bougie. — Le degré de perméabilité est lié au diamètre des pores, à l'épaisseur de la paroi filtrante et, indirectement, à la surface de la bougie. On sait que le filtre Berkefeld l'emporte, comme *porosité*, sur le filtre Chamberland; c'est ainsi qu'il se laisse traverser par l'organisme de la horse-sickness, que retient la bougie de porcelaine F (Nocard). On sait aussi que cette bougie F se montre plus perméable que le cylindre B; c'est ce qui explique le passage de l'agent de la péripneumonie à travers la première seule (Nocard et Roux). En regard de ces notions, aujourd'hui courantes, nous mentionnerons, comme fort importantes, les différences de texture des diverses bougies Berkefeld. Des expériences répétées, faites depuis 1898, nous ont démontré que le filtre Berkefeld était manifestement plus poreux autrefois qu'aujourd'hui; comme ce filtre est construit

en vue d'arrêter les germes, on ne saurait raisonnablement s'en plaindre [1].

L'*épaisseur* des bougies est toujours calculée en proportion de leur porosité. Aussi, à diamètre égal, le cylindre Berkefeld possède-t-il une lumière bien inférieure à celle du cylindre Chamberland. On peut toutefois diminuer l'épaisseur de la bougie Berkefeld jusqu'à une certaine limite, sans permettre le passage des microbes vulgaires. On favorise alors d'autant plus celui du microbe pestique.

Quant à la *surface* de la bougie, elle intervient sur la rapidité de l'opération, et son action n'est pas négligeable, lorsqu'il s'agit de liquides difficiles à filtrer. Les filtrations lentes à la bougie Berkefeld (et surtout à la bougie Berkefeld amincie) ont en effet un double inconvénient ; elles rendent plus malaisé le passage des germes pestiques et facilitent, au contraire, celui de certains organismes communs très mobiles servant de test-objets (comme, par exemple, les vibrions de l'eau de conduite), ce qui enlève toute signification à l'expérience. En conséquence, plus la filtration sera lente et plus il conviendra d'augmenter la surface de la bougie.

Facteur microbe. — Il faut évidemment envisager le *volume* de l'organisme, mais celui-ci n'est point seul en cause. La *mobilité* joue un rôle important (peut-être l'agent de la peste bovine est-il immobile). D'autre part, le *nombre* des germes nous paraît capital, surtout en matière de parasites non cultivables. Pour expliquer bien des expériences négatives (sinon la majorité), il convient de se rappeler que les humeurs pestiques sont relativement pauvres en germes, qu'on les dilue le plus souvent avant de les filtrer, qu'une proportion sans doute élevée de microbes se trouve, quoi qu'on fasse, forcément arrêtée par la bougie, et qu'enfin, comme nous l'avons démontré antérieurement (2ᵉ mémoire sur la peste bovine), la *dilution* d'une dose sûrement mortelle de virus peut rendre celui-ci simplement vaccinant ou même inactif [2]. Or, un virus filtré représente toujours un virus fortement dilué.

1. Les bougies « très poreuses », que la maison Berkefeld a bien voulu nous faire construire l'an dernier, n'offrent pas, elles-mêmes, la perméabilité des anciens filtres.

2. On peut, il est vrai, recourir à la concentration du filtrat ; le moyen n'est

Il ne faut pas oublier non plus que, seuls, des *germes* parfaitement *libres* sont susceptibles de traverser les cloisons poreuses. Si, comme nous le pensons, le microbe pestique présente habituellement un siège intraleucocytaire, on conçoit que tous les parasites, inclus dans les leucocytes ou leurs débris, soient fatalement arrêtés par les filtres.

Facteur milieu. — Depuis les recherches de MM. Nocard et Roux, sur le microbe de la péripneumonie, on sait qu'une *teneur*, même modérée, en *sérosité* suffit déjà pour empêcher le passage des germes « invisibles ». C'est là un nouvel élément d'insuccès dans les recherches entreprises avec le virus pestique, car on se trouve souvent pris entre deux inconvénients ; si l'on n'étend point les liquides riches en sérosité, les germes peuvent être arrêtés ; si on les étend, la dilution peut produire les effets que nous avons rappelés tout à l'heure.

Facteurs température et pression. — Nous n'avons jamais eu recours à l'élévation de la température, d'autant que nous avons remarqué combien, en été, lors des filtrations lentes, les vibrions des eaux offrent de la tendance à traverser les bougies Berkefeld (surtout amincies).

Nous avons employé, d'ordinaire, la filtration par *aspiration*, mais la filtration par *pression* présente sur elle des avantages incontestables, quand on s'adresse à des cylindres d'épaisseur normale.

***

Ces réflexions faites, nous devons insister sur le *soin qu'il convient d'apporter aux expériences*, pour pouvoir en tirer une conclusion ferme. Alors même que nous opérions avec des bougies normales, nous n'avons jamais manqué d'additionner le liquide à filtrer de germes jouant le rôle de *test-objets*. Tout d'abord, nous nous sommes servis d'un bactérium du choléra des poules tuant « à l'unité », puis il nous a semblé plus démonstratif d'employer l'eau de conduite du laboratoire. Celle-ci est riche en microbes variés, et contient toujours des vibrions très fins et très mobiles, qui représentent le meilleur des indicateurs. En effet, toutes les fois que nous avons eu affaire à des filtra-

pas mauvais, mais il reste infidèle, ce qui tient sans doute à la difficulté de le réaliser comme il faudrait.

tions pénibles (surtout l'été) ou bien que, nous servant de bougies Berkefeld amincies, l'épaisseur de la paroi filtrante n'avait pas été rigoureusement calculée, les vibrions hydriques ont passé à travers la cloison poreuse, le plus souvent à l'état pur[1]. Nous avons même tenté plusieurs expériences d'isolement de ces vibrions, à l'aide de cylindres Berkefeld suffisamment amincis, et ces expériences ont parfaitement réussi.

Ajoutons que, toutes les fois que nous éprouvions le filtrat de liquides virulents préalablement mêlés à l'eau de conduite, nous avions soin de laisser séjourner ce filtrat plusieurs jours *à* 37° *et ensuite* plusieurs jours *à* 22°, car les microbes des eaux et spécialement les vibrions peuvent fort bien ne pas se développer à la température du corps.

Nous conclurons de ce qui précède que la filtration, appliquée à l'étude des microbes dits invisibles, doit être pratiquée en s'entourant des plus grandes précautions. Si nous n'avions point recherché systématiquement les causes d'erreur, nous aurions été amenés à considérer comme positives certaines expériences qui ne l'étaient pas ou qui, tout au moins, pouvaient prêter à discussion. Il n'en est que mieux établi que le virus pestique peut traverser les filtres. Pour expliquer l'inconstance des résultats, on se reportera à ce que nous avons dit plus haut et on incriminera, par conséquent, les causes suivantes : teneur *relativement* faible en germes des produits virulents ; influence de la dilution sur les résultats expérimentaux ; et, d'après nous, situation intraleucocytaire habituelle de l'agent pathogène. On peut admettre aussi que cet agent est dépourvu de mobilité, circonstance défavorable à la traversée des bougies. Toujours est-il que, s'il était cultivable[2], on observerait, nous en sommes convaincus, un tableau bien différent.



Ceci posé, nous diviserons nos expériences en 3 *groupes*,

1. Nous aurions pu employer, comme test-objets, les cultures de ces vibrions. Nous ne l'avons pas fait pour deux raisons : d'abord il valait mieux s'adresser à la flore multiple des eaux; ensuite, en culture, nos vibrions hydriques perdent rapidement leur finesse.

2. Nous rappellerons, à propos des cultures, que les quelques résultats positifs, observés par nous (résultats dont il est fait mention dans notre pli à l'Académie), semblent plutôt explicables par une conservation exceptionnellement longue de virus, *in vitro*.

selon qu'elles ont été faites avec la bougie Berkefeld amincie, la bougie Berkefeld normale ou la bougie Chamberland normale (modèle F).

Filtration sur la bougie Berkefeld amincie.

(Filtration par aspiration). Suivant les cas, le filtrat se montre inactif, vaccinant ou virulent. Nous avons rapporté, dans notre pli à l'Académie, deux expériences très démonstratives, concernant les *filtrats infectieux*. Nous choisirons, parmi nos essais ultérieurs, les deux suivants qui sont particulièrement intéressants.

Exp. n° 1. — Le 23/7/1899, on broie 10 grammes de cerveau virulent, avec 90 c. c. d'eau; puis on laisse déposer 20 heures à la glacière. Le 24/7, on décante et on clarifie le liquide décanté par « plasmisation ». On ajoute ensuite 1 c. c. de culture de choléra des poules (échantillon tuant le pigeon à l'unité). On filtre sur une bougie Berkefeld amincie (dont le diamètre total a été réduit de 25 à 21 millimètres). On inocule 5 c. c. du filtrat à 4 pigeons, qui résistent, et, le lendemain, 60 c. c. à un veau (77-47) qui contracte la peste bovine (voir courbe n° 1).

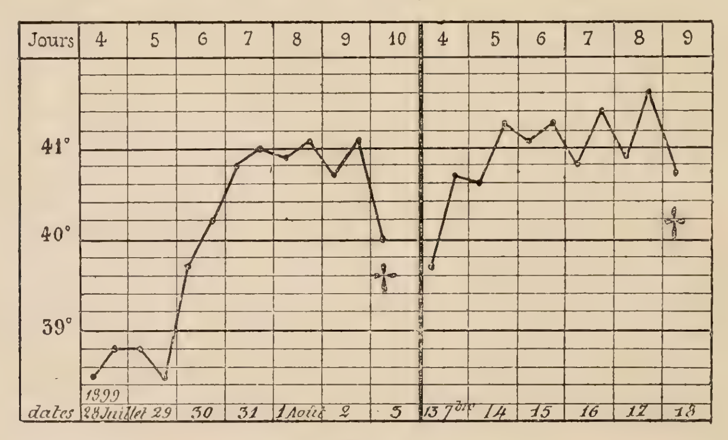


Fig. 1.

Sous le nom de « plasmisation », nous désignons le procédé de clarification suivant, à la fois très simple et susceptible de rendre des services dans certaines circonstances. Une émulsion trouble est additionnée, en général, d'un dixième de plasma de cheval, obtenu par refroidissement du sang. On mêle intimement et on laisse coaguler. Rien n'est plus facile ensuite que de

séparer le liquide clair du caillot qui englobe les particules en suspension.

Exp. n° 2. — Le 9/9/1899, on délaie 85 c. c. de liquide diarrhéique virulent, dans 850 c. c. d'eau de conduite. On décante et on plasmise. On filtre sur une bougie Berkefeld amincie (*ut supra*) et on ensemence, en bouillon, 50 c. c. du filtrat; le mélange reste stérile à 37° et à 22°. On inocule, le 10/9, 150 c. c. du filtrat à un veau (789) qui prend la peste bovine, *avec apparition du piroplasma bigeminum dans le sang*[1] (voir courbe n° 2).

L'observation suivante est la plus curieuse, parmi celles qui nous ont donné des *filtrats vaccinants.*

Exp. n° 3. — Le 20/10/1899, on étend au 5e, avec de l'eau de conduite, les matières fécales de la chèvre n° 78-53 (voir 2e mémoire), qui vient de succomber à la peste bovine. On décante et on plasmise. 200 c. c. du liquide clair sont étendus d'eau, au volume de 1,200 c. c. On filtre sur bougie Berkefeld amincie (*ut supra*) et on inocule un litre du filtrat à un animal d'Anatolie, âgé d'un an. Cet animal reste en bonne santé, mais, éprouvé 9 jours après, il résiste. Après avoir recueilli le liquide destiné à l'inoculation, on fait passer, immédiatement, sur la bougie, un mélange de 200 c. c. de bouillon et de 200 c. c. d'eau de conduite. Ce mélange, filtré, demeure stérile (à 37° et à 22°).

Filtration sur la bougie Berkefeld normale.

On obtient, encore ici, des filtrats inactifs, vaccinants ou infectieux, mais les expériences négatives sont plus fréquentes que précédemment, ce qui était du reste à prévoir. Notre pli contient deux observations d'infection et une de vaccination par les liquides filtrés (aspiration). En recourant à l'*aspiration*, les résultats positifs se réduisent souvent à la vaccination des animaux; l'expérience n° 4 va nous en fournir un nouvel exemple. En s'adressant à la *pression*, on observe, à côté des cas négatifs ou des cas de vaccination (exp. n° 6), des cas d'infection tout à fait caractéristiques (exp. n° 5).

Exp. n° 4. — Le 28/9/1899, on filtre, *par aspiration*, sur une bougie Berkefeld normale, 250 c. c. de liquide péritonéal (voir, pour la préparation de ce liquide, notre 2e mémoire). Ces 250 c. c. filtrés sont inoculés à un animal d'Anatolie, âgé de 2 ans. L'animal reste bien portant, mais résiste à l'infection le 10e jour. Après prélèvement du filtrat, on fait passer, sur la bougie, 800 c. c. de bouillon, additionnés de 100 c. c. d'eau de conduite. Le liquide filtré demeure stérile (à 37° et à 22°).

1. Cette expérience démontre, de la façon la plus schématique, l'influence du virus pestique sur le « réveil » de la piroplasmose latente.

Exp. nº 5.—Le 28/6/1900, on filtre *par pression* (1.1/2 atmosphère), sur une bougie Berkefeld normale, 100 c. c. de bouillon, mêlés à 20 c. c. d'eau de conduite. Le filtrat reste stérile (à 37º et à 22º). On fait passer sur la bougie, immédiatement après, 210 c. c. de liquide de lavage péritonéal, qui sont inoculés le lendemain à un veau (80-73); l'animal prend la peste bovine (voir courbe nº 3). On notera ici la longueur de l'incubation, en rapport évidemment avec le faible nombre des germes inoculés et leur dilution.

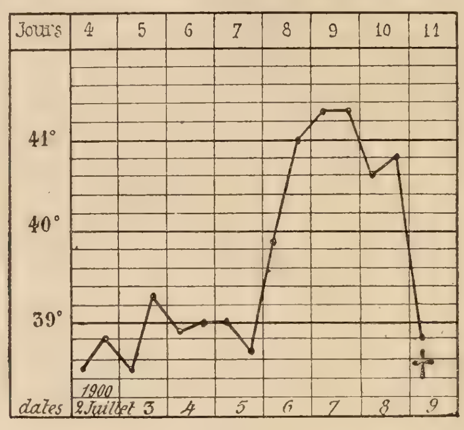


Fig. 2.

Exp. nº 6. — Le 2/5/1900, on filtre, *par pression* (1.1/2 atmosphère), sur une bougie Berkefeld normale, 150 c. c. d'eau de conduite. Le filtrat demeure stérile (à 37º et à 22º). On fait passer sur la bougie, immédiatement après, 50 c. c. de liquide de lavage péritonéal, qui sont inoculés à un animal de race mixte (Crimée-Anatolie), âgé d'un an. Cet animal reste bien portant, mais résiste à l'infection le 12e jour.

Filtration sur la bougie Chamberland (F) normale.

(Par aspiration). On réussit rarement et encore n'arrive-t-on qu'à vacciner les animaux.

Exp. nº 7. — Le 11/12/1899, on étend d'eau, au 5e, un mélange de divers liquides céphalo-rachidiens virulents. On filtre sur un cylindre F et on inocule un litre de filtrat à un animal d'Anatolie, âgé d'un an. Cet animal demeure en bonne santé, mais résiste à l'épreuve le 15e jour. Après prélèvement du filtrat, on fait passer sur la bougie 300 c. c. de bouillon, additionnés de 20 c. c. d'eau de conduite. Le mélange reste stérile (à 37º et à 22º).

***

Nous concluons, des expériences rapportées dans notre pli cacheté, de celles qui précèdent et d'autres encore (qu'il nous a paru inutile de relater), que le microbe pestique peut traverser

les filtres. Il ne les traverse cependant que si certaines conditions se trouvent réalisées.

Nul doute que l'on ait affaire à un organisme « invisible ». Cette manière de voir concorde d'ailleurs avec l'impossibilité de discerner au microscope des formes caractéristiques quelconques, lors de l'étude à l'état frais des produits virulents, et avec l'échec de toutes les méthodes de coloration connues et de plusieurs procédés nouveaux, imaginés par nous.

Nous ferons observer, en terminant, que les animaux inoculés au cours des recherches sur la filtration ont été rigoureusement isolés en dehors de l'Institut bactériologique et soignés par un garçon spécial. Pour plus de précaution, on n'a commencé à prendre leur température que le quatrième jour après l'inoculation. Enfin, toutes les fois que l'on a éprouvé des sujets qui avaient résisté au virus filtré, on a fait, en même temps, au moins un témoin. Aucune erreur ne s'est donc glissée dans nos expériences, d'ailleurs fort nombreuses.

***

Nous devons, maintenant, indiquer en peu de mots les raisons qui nous portent à croire que le virus pestique offre habituellement un *siège intraleucocytaire* (peut-être même intraphagocytaire, comme, par exemple, le bacille du rouget, chez le pigeon ou la souris infectés). Il s'agit d'ailleurs d'une *présomption* et non d'une certitude, mais les arguments suivants, *réunis*, ne paraîtront sans doute pas dépourvus de valeur.

Tout d'abord, il convient de remarquer que le virus, qui ne donne jamais de lésion au point inoculé, n'offre, dans ses localisations secondaires, aucune particularité permettant d'admettre un développement libre au sein des humeurs (on ne constate, en effet, ni épanchements, ni exsudats quelconques). D'autre part, les humeurs pauvres en éléments figurés, comme le liquide céphalo-rachidien ou la sérosité oculaire, se montrent bien moins riches en germes que les humeurs où abondent les cellules, telles le sang.

On a affaire, sans conteste, à un virus principalement hématique (ou même principalement vasculaire, si les parasites se rencontrent aussi dans les endothéliums des vaisseaux, — la chose est, relativement, peu importante). Pour savoir si l'agent

pathogène réside dans le plasma, les hématies, ou les leucocytes, reportons-nous à une curieuse expérience de M. Kolle, expérience que nous regrettons de n'avoir pu répéter et modifier de diverses façons. Notre savant collègue centrifuge du sang défibriné virulent, et constate que le sérum demeure inoffensif, tandis que le dépôt tue les animaux. Or, l'épreuve réussit aussi bien avec le sang laqué par l'eau distillée qu'avec le sang étendu de solution physiologique. Nous en concluons que les germes sont vraisemblablement contenus dans les seuls éléments résistant au laquage, c'est-à-dire les globules blancs[1]. Du reste, les sérosités dépourvues d'hématies, comme l'humeur aqueuse ou le liquide céphalo-rachidien, apparaissent toujours parfaitement virulentes.

Notons encore ce fait que le parasite se conserve fort mal en dehors de l'organisme. Nous attribuons, en grande partie, sa mort rapide à sa sensibilité vis-à-vis des alexines intraleucocytaires. Ne se trouve-t-il pas, en quelque sorte, dans les mêmes conditions que certaines bactéries connues (bacillus anthracis, streptocoque) que l'on voit périr très vite au sein des exsudats riches en leucocytes, tandis qu'elles demeurent plus longtemps vivantes au sein des humeurs (Metchnikoff, Bordet).

Enfin, l'immunité pour ainsi dire illimitée (voir notre 1er mémoire) des animaux qui ont résisté à la maladie, comparée à l'excessive gravité de celle-ci, — le pouvoir thérapeutique constant du sérum des sujets guéris, — et la possibilité d'obtenir, en peu de jours, un anti-corps spécifique, en partant des bovidés neufs (voir notre 2e mémoire), indiquent manifestement, selon nous, un rapport très intime de l'agent pathogène avec le système phagocytaire.

Nous pensons que notre manière de voir s'applique aussi à d'autres affections et que la notion du siège intraleucocytaire de certains parasites, encore inconnus, pourra peut-être rendre des services dans leur étude.

1. Il n'y a aucune raison de penser à un rapport quelconque de ces germes avec les hématoblastes, lesquels n'offrent d'ailleurs rien d'anormal dans la peste bovine, ainsi que nous l'avons constaté à maintes reprises.

Études sur un lait fermenté comestible

LE « LEBEN » D'ÉGYPTE

Par MM.

EDOUARD RIST et JOSEPH KHOURY

Ancien interne des hôpitaux de Paris.

Ancien préparateur de chimie à l'École de pharmacie de Montpellier.

Sous le nom de *leben raïb* ou tout simplement de *leben* dans l'Orient arabe, de *yaourte* en Grèce et en Turquie, on désigne un lait caillé spécial, dont l'usage alimentaire est universellement répandu parmi les populations levantines. En Égypte, on produit le *leben* au moyen du lait de buffle, de vache ou de chèvre. Chaque famille fabrique le sien, et en conserve un peu, en guise de levain, pour provoquer, au fur et à mesure des besoins, la fermentation de nouvelles quantités de lait frais.

L'opération s'accomplit de la manière suivante : le lait est d'abord porté à l'ébullition, puis versé dans des jattes où on le laisse refroidir. Lorsqu'il a atteint la température de 40° environ, on l'ensemence avec un peu de vieux leben, auquel on donne le nom de *roba*. Au bout de six heures en moyenne en été — un peu plus en hiver — le lait est pris. Il forme un caillot assez floconneux, blanc, d'où exsude du sérum en petite quantité. C'est alors un mets d'un goût aigrelet, sucré, frais et réellement fort agréable, d'un arome *sui generis*. Il est très apprécié des indigènes et on le sert même souvent sur les tables européennes.

Si on laisse la fermentation se prolonger, l'acidité augmente, et, au bout de 2 ou 3 jours le leben est immangeable.

Le leben se fabrique en Égypte, de la manière que nous venons d'indiquer, depuis des siècles. Il en est fait mention par les auteurs les plus anciens; outre sa popularité comme ali-

ment, il a joué et joue encore un rôle prépondérant dans la médecine arabe. Mais nous ne savons — pour n'avoir pas eu l'occasion de les comparer — si les lebens de Syrie et d'Arabie, si même les yaourtes turques et grecques sont absolument identiques au mets égyptien. Au moment où nous achevions cette étude, nous avons pu constater, à la lecture de la fort intéressante thèse de M. Arnold[1], que le leben fabriqué par les indigènes d'Algérie est très différent de celui qu'on mange en Égypte, et que sa fermentation est due à d'autres microorganismes. Il est fort probable qu'il se fabrique encore ailleurs d'autres variétés de leben. Les faits que nous exposerons dans le cours du présent mémoire se rapportent donc exclusivement au leben d'Égypte.

I

L'analyse chimique de différents échantillons de leben nous a fait voir que son acidité était due en grande partie à la présence de l'acide lactique, et qu'il contenait toujours une certaine quantité d'alcool, dont la production, assez limitée, ne s'accompagnait d'ailleurs d'aucune effervescence. Il s'agissait donc d'une fermentation complexe, analogue à celle du képhir, et dont il pouvait être intéressant de faire l'étude détaillée.

De nombreux échantillons, de provenances très diverses, examinés au microscope après coloration par le violet de gentiane en solution hydro-alcoolique ou par la fuchsine de Ziehl à froid, nous ont toujours donné des images identiques sous l'objectif. Parmi les flocons de caséine et les gouttelettes de beurre, on remarque de nombreux microorganismes qui appartiennent à cinq types distincts :

I. — Un bacille assez gros, à bouts carrés, se mettant volontiers en chaînettes de 5 à 10 éléments, chaînes qui s'incurvent légèrement en arc et ont une tendance à se grouper entre elles parallèlement, par faisceaux.

II. — Un bacille à peu près aussi long, mais beaucoup plus grêle, se montrant toujours par éléments isolés.

III. — Un diplocoque à grains un peu aplatis, ayant une

1. Montpellier, 1899.

certaine ressemblance morphologique avec le gonocoque.

IV. — Une levure à gros grains ovoïdes, trapus.

V. — Une levure beaucoup plus allongée, en moyenne quatre fois aussi longue que large.

Sauf dans des laits caillés datant de plus d'une semaine, nous n'avons jamais aperçu de microorganismes d'un autre type. L'ébullition préalable tue-t-elle tous les germes contenus dans le lait frais? Et la couche épaisse de crème qui se forme à la surface des jattes où se fait la fermentation suffit-elle à préserver le lait des germes atmosphériques? Ou bien faut-il supposer que la présence des microorganismes spécifiques du leben est un obstacle au développement d'autres espèces? C'est une question que nous n'avons pas cherché à résoudre.

Sur des préparations de sérum, en gouttes pendantes, nous n'avons jamais noté aucun mouvement spontané de ces organismes. Ils se colorent très bien, tous cinq, par la méthode de Gram, ce qui permet d'obtenir des préparations très claires et très propres, où levures et bactéries apparaissent seules.

II

Notre premier soin, une fois ces constatations préalables faites, fut de conserver dans notre laboratoire des échantillons qui puissent être toujours comparables entre eux. Nous avons donc distribué dans un grand nombre de tubes à essai, puis stérilisé à l'autoclave à 115° pendant 10 minutes, deux litres d'un même lait de vache. Ces tubes, ensemencés ensuite au fur et à mesure des besoins, nous ont servi pour tous nos essais.

Puis nous avons procédé à la séparation des espèces et à leur isolement en culture pure. Mais dès le début nous avons eu à surmonter certaines difficultés assez inattendues. Dans nos premiers ensemencements, faits par dilutions successives, sur des tubes inclinés de gélose au bouillon de bœuf salé et peptonisé, les deux levures se développaient seules après 24 heures d'étuve à 37°.

Les deux bacilles et le diplocoque n'apparaissaient pas sur ce milieu de culture. Pensant que ces espèces réfractaires étaient peut-être des anaérobies stricts, nous avons fait des cultures

dans la profondeur de la gélose préalablement glycosée à 2,5 0/0 selon la méthode de Liborius modifiée par Veillon.

Nous avons fait, en général, 6 à 8 dilutions successives, de manière à obtenir des colonies bien séparées, et nous avons répété les ensemencements un grand nombre de fois avec des échantillons divers. Nous avons obtenu des tubes constitués de la manière suivante :

Les deux centimètres supérieurs de la gélose étaient occupés par de grosses colonies d'un jaune ambré, discoïdes, à bords nets, à développement rapide, et par d'autres, à développement plus rapide encore, qui poussaient autour d'elles des prolongements ramifiés élégants, en forme de houppes. Les premières étaient constituées par la levure ovoïde, les secondes par la levure allongée, ce que l'on vérifiait facilement par repiquage sur gélose ordinaire en surface.

Au-dessous de la zone limite, ces deux espèces disparaissaient complètement. En revanche, on en distinguait d'autres, beaucoup plus petites, et à développement précaire. Les unes, nuageuses, transparentes, extrêmement frêles, répondaient au gros bacille si abondant sur les préparations de leben. Les autres, opaques, nettes, sphériques, répondaient au diplocoque. Tardivement on voyait apparaître dans la profondeur quelques colonies analogues d'aspect à celles de la levure ovoïde, mais qui, à l'examen microscopique, se montraient constituées par le bacille fin et rare.

Nous retrouvions donc dans ce milieu les cinq espèces que nous avait révélées le microscope. En coupant à un niveau convenable le tube de Liborius, nous avons pu repiquer dans des tubes nouveaux et y obtenir des cultures pures des deux bacilles et du diplocoque. Nous eûmes la surprise de voir que les trois espèces se montraient aérobies facultatives. Mais elles ont obstinément refusé de pousser en surface sur des tubes de gélose ordinaire en surface. Il en fut de même pour le bouillon de bœuf peptonisé salé et pour le lait.

Nous n'avons pu les isoler facilement qu'en profitant de l'aérobiose exclusive des levures. Du lait stérile, privé d'air par l'ébullition, fut ensemencé avec du leben et mis dans un tube de Pasteur que nous scellâmes, après vide fait à la trompe. Le lendemain, après un séjour de 24 heures à l'étuve, le lait

était coagulé, mais l'examen microscopique n'y révélait plus que des bacilles et des diplocoques : les levures avaient entièrement disparu. Nous répétâmes encore une fois l'expérience, et nous fîmes avec ce leben cultivé dans le vide des ensemencements sur gélose glucosée, mais au contact de l'air. Le lendemain, nous avions à la surface de notre gélose, à l'exclusion de toute colonie de levures, deux sortes de colonies :

Les unes, irrégulières, d'un blanc argenté, ressemblaient à de petits flocons de givre ; elles se montrèrent constituées par un bacille gardant le Gram, qui, semé dans du lait, le fit coaguler en moins de 24 heures, et qui était identique à notre premier bacille.

Les autres, rondes, convexes, chatoyantes, translucides, bleuâtres par transparence, répondaient à notre deuxième bacille. Semé dans du lait, ce microorganisme le rendit rapidement acide, mais sans le faire coaguler.

Restait le diplocoque, qui, malgré plusieurs tentatives réitérées, refusait de pousser sur ce milieu. Nous l'avons obtenu facilement, au contraire, en semant le leben débarrassé de ses levures sur de la gélose lactosée à 2 0/0. Il y donna des colonies opaques, d'un blanc laiteux, très analogues à celles du streptocoque pyogène, qui se laissèrent repiquer facilement ensuite sur gélose glucosée. Cette difficulté que présente le diplocoque à pousser d'emblée sur la gélose glucosée en surface est d'autant plus paradoxale que ce microbe pousse fort bien, et d'emblée, dans la profondeur de ce milieu, disposé comme dans les tubes de Liborius. Semé dans du lait, il l'acidifie et le coagule en moins de 24 heures.

Nous avions donc, à partir de ce moment, les cinq microorganismes du leben isolés en culture pure. Ces isolements, recommencés plusieurs fois avec des échantillons différents, nous ont toujours fait aboutir aux mêmes résultats. Enfin, si nous ensemencions du lait stérilisé avec les cinq microorganismes provenant de nos cultures, nous obtenions, après quelques tâtonnements, un lait caillé identique au leben comme aspect, comme goût et comme composition chimique.

Parmi ces cinq microorganismes, deux seulement, le gros bacille — *streptobacillus lebenis* — et le diplocoque — *diplococcus lebenis* — font coaguler le lait. Ils produisent en même temps

de l'acide lactique. Nous verrons tout à l'heure que la coagulation se produit également lorsqu'on neutralise l'acide lactique au fur et à mesure de sa production, et que ces deux microbes sécrètent une présure.

Quant aux deux levures dont l'une est une levure vraie, — *saccharomyces lebenis*, — et l'autre, la plus allongée, un mycoderme, — *mycoderma lebenis*, — elles ne sont ni l'une ni l'autre capables de faire fermenter le lactose. Semées dans du lait, à l'état de pureté, elles s'y multiplient faiblement sans produire d'alcool. Mais elles font fermenter toutes deux énergiquement le sucre interverti. Il y avait donc lieu de supposer que l'un quelconque des autres microorganismes sécrétait une invertine du lactose. Nous avons cru d'abord que ce rôle était dévolu au bacille fin — *bacillus lebenis* — et nous avons constaté en effet qu'en sa présence le sucre de lait subit la fermentation alcoolique. Mais le streptobacille est à ce point de vue bien plus actif encore.

On voit que le rôle de chacun des microorganismes dans cette fermentation symbiotique méritait d'être étudié d'un manière détaillée. C'est ce que nous avons tenté de faire.

III

Nous allons donner d'abord la description aussi complète que possible de chacune des espèces.

§ 1. — *Streptobacillus Lebenis.*

C'est un bâtonnet rectiligne, à bouts carrés, immobile, dépourvu de cils vibratiles et de capsule, long de 6 à 8 μ en moyenne, épais de 1/2 μ. Il forme volontiers, dans les milieux liquides (bouillon), des chaînes assez longues, où il peut être malaisé de distinguer chaque article. Sur les préparations colorées par la fuchsine phéniquée à froid on voit très bien, au contraire, un espace clair entre les éléments. Dans ces chaînes, qui ont une tendance à se grouper parallèlement par faisceaux, on rencontre parfois des articles très allongés qui atteignent jusqu'à 18 μ. Dans les cultures anciennes, ces dimensions sont de beaucoup dépassées : le bacille s'allonge, s'épaissit, prend des formes bos-

suées en massue; la trame protoplasmique, d'homogène qu'elle paraissait, devient granuleuse et prend irrégulièrement la couleur.

Il s'agit alors de formes de régression. D'autres fois, dans certaines cultures en bouillon, on trouve des flocons constitués par un véritable chevelu de bacilles extrêmement contournés; là encore, à côté de filaments d'épaisseur normale, on en trouve d'autres beaucoup plus épais.

Dans le lait, comme à la surface de la gélose lactosée ou glucosée ces formes filamenteuses manquent; le microbe s'y présente en bâtonnets d'épaisseur constante, de longueur peu variable, presque toujours isolés ou formant des chaînes très courtes.

Le meilleur moyen de le conserver vivant, est de le cultiver dans du lait à la température ordinaire. Il suffit alors de le repiquer tous les mois. Sa vitalité est précaire dans la profondeur de la gélose sucrée. Deux ou trois jours après que les colonies sont devenues visibles à l'œil nu, les réensemencements en demeurent stériles. Il en est de même, à peu de chose près, à la surface de la gélose sucrée. Au début, lors de la séparation des espèces, l'acclimatement du microbe à ce milieu peut même être — selon les échantillons — très difficile. Il arrive que le bacille pousse sur la gélose lactosée ou glucosée en même temps que les autres microbes, mais que les repiquages sur ce même milieu, pour l'obtention de cultures pures, demeurent obstinément stériles. Ou bien l'on parvient à obtenir une première culture pure qui ne se laisse pas réensemencer. Il faut alors faciliter l'acclimatement en faisant repasser le microbe par le milieu qui lui est favorable, le lait. On finit ainsi par l'accoutumer à pousser sur la gélose sucrée et dans le bouillon sucré : il y vit huit jours ou même un peu plus à la température ordinaire. A l'étuve il pousse plus vite, mais meurt beaucoup plus rapidement. Les réensemencements doivent toujours être faits largement, sous peine de demeurer stériles.

Toutes les couleurs d'aniline colorent le streptobacille. Le procédé, de Gram qui colore admirablement le bacille vivant le décolore, au contraire, lorsqu'il est mort. C'est une épreuve utile qui permet de prévoir à coup sûr si tel réensemencement fait en prélevant sur telle culture sera oui ou non fertile. Tant qu'il reste sur la préparation quelques éléments colorés, et pourvu qu'on sème sur un milieu favorable (lait), on sera assuré d'un résultat positif.

Sur la surface de la gélose lactosée ou glucosée, on obtient, en 48 heures d'étuve à 37°, des colonies, qui, à l'œil nu, présentent l'aspect suivant : ce sont de petites taches plates, à contours irréguliers, à surface irrégulière, — presque complètement incolores par réflexion, à ce

point qu'on les distingue à peine du milieu, — d'un gris pâle légèrement bleuâtre par transparence. Elles sont translucides; il semble que leur surface grise soit traversée de stries brillantes. L'éclat argenté de ces colonies, l'irrégularité de leurs bords et de leur surface les fait ressembler à de petits flocons de neige en train de fondre.

Examinées sous le microscope à un faible grossissement (Zeiss : obj. 16 ‰, aper. 0,30 ; ocul. n° 2), ces colonies semblent composées de circonvolutions irrégulièrement incurvées et enchevêtrées, que séparent des sillons. Leur couleur est brune au centre et se perd vers les bords.

Ces colonies augmentent peu de grandeur. Il est bien rare que, dans des tubes où elle sont très isolées, elles atteignent 4 ‰ de diamètre. Le plus communément, elles restent à 1,5 ou 2 ‰.

Dans la profondeur de la gélose sucrée (tubes de Liborius), les colonies du streptobacille sont de consistance extrêmement ténue; elles ont l'air sur le point de se dissoudre dans le milieu; transparentes, prenant la couleur de la gélose, elles ont un aspect nuageux, des contours mal définis.

Sur la gélose ordinaire au bouillon salé peptonisé, sans addition de sucre de raisin ou de sucre de lait, le bacille, comme nous l'avons vu, refuse absolument de pousser. Il en est de même sur la gélatine ordinaire, en stries ou en piqûres. Pour s'assurer si la trypsine est au nombre des ferments qu'il produit, il faut le semer par piqûres dans la gélatine lactosée à 2 0/0. Le microbe y pousse mal et très lentement ; la culture ne forme pas une ligne continue ; mais on voit, tout le long de la piqûre, un chapelet de colonies de grosseur variée — jusqu'à une petite tête d'épingle — blanches, très denses, opaques, à bords parfaitement circulaires. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur pomme de terre, il n'y a pas de développement.

Dans le bouillon ordinaire salé peptonisé, le streptobacille refuse de pousser. Dans ce même bouillon additionné de lactose ou de glucose, il pousse, mal au début, puis de mieux en mieux, troublant d'abord le liquide, qui, lorsqu'on l'agite, prend un aspect chatoyant et moiré, puis se précipitant au bout de quelques jours en gros flocons au fond du vase.

Nous l'avons semé aussi dans du petit-lait, obtenu par filtration de lait coagulé par la présure sur une bougie Chamberland à la pression de 4 ou 5 atmosphères. La culture s'y faisait assez mal, demeurait peu abondante et s'épuisait vite.

Nous avons vu déjà que le streptobacillus Lebenis est indifféremment aérobie et anaérobie. Nous l'avons cultivé dans le vide ou dans une atmosphère d'hydrogène, soit dans du bouillon sucré, soit à la

surface de la gélose sucrée. Dans aucune de ces cultures il ne se fait de développement apparent de gaz.

Dans aucune condition, nous n'avons observé de production de spores.

Semé dans du lait, le streptobacillus Lebenis le fait coaguler à l'étuve à 37° en six heures environ. Le lait ainsi coagulé est très nettement acide; le microbe fait en effet subir au sucre de lait la fermentation lactique. Nous avons mesuré cette acidité dans une culture sur petit-lait de 24 heures : elle était de 0gr,261 0/0, exprimée en acide lactique.

Cette quantité d'acide lactique était-elle suffisante pour expliquer la coagulation du lait? Pour nous en assurer, nous avons fait les expériences suivantes. A cinq tubes contenant respectivement 19, 18, 16, 14 et 12 c. c. de lait stérilisé, nous avons ajouté le contenu de tubes renfermant 1, 2, 4, 6 et 8 c. c. d'une solution d'acide lactique à 1 0/0, de manière à avoir dans chaque tube un volume total de 20 c. c. Le tout a été mis à l'étuve à 37° et observé après six heures de séjour. A ce moment, trois tubes sur cinq étaient coagulés. Les tubes furent remis à l'étuve, et retirés de nouveau au bout de 24 heures. Ils avaient conservé le même aspect. Nous avons procédé alors au dosage de l'acidité totale de chacun des tubes mis en expérience afin de tenir compte des pertes de liquide subies par la stérilisation, le transvasement, etc. Voici le tableau des résultats :

Tube n° 1	acidité exprimée en a. lactique °/o	= 0,215	: lait non coagulé.
2	»	= 0,342	: »
3	»	= 0,558	: coagulation peu nette.
4	»	= 0,720	: coagulation nette.
5	»	= 0,990	: »

Ainsi notre streptobacille coagule le lait avec une acidité de 0,26 0/0, tandis qu'une acidité de 0,34 0/0 ne produit pas le même effet en l'absence de microorganisme. Le caillot produit par l'acide lactique seul est d'ailleurs différent comme aspect : il est plutôt constitué par des grumeaux nettement séparés de la portion séreuse, tandis que, sous l'influence du streptobacille, le lait se prend en un seul bloc.

Nous avons encore, reprenant une expérience faite par Freudenreich pour déceler la production de caséase par des ferments lactiques, cultivé notre bacille dans du lait additionné d'une grande quantité de carbonate de chaux, afin de neutraliser l'acide lactique au fur et à mesure de sa production. Dans ces conditions, le lait se coagule à l'étuve en moins de 24 heures.

Il faut donc admettreque notre bacille, tout ferment lactique qu'il est, sécrète une présure. En revanche il ne sécrète pas de caséase. Des tubes que nous avons conservés pendant des mois ont été retrouvés inaltérés, et nous n'avons pu, par nos analyses, y déceler de peptones.

§ 2. — *Bacillus Lebenis.*

C'est un bacille très mince, long de 2 à 6 μ, parfois un peu incurvé, immobile, dépourvu de cils vibratiles et de capsule. Il se présente ordinairement sous formes d'éléments isolés, forme des amas lorsqu'on le cultive sur des milieux solides, mais jamais de chaînes. Il arrive que, dans les cultures un peu anciennes dans le lait, on trouve deux ou trois bacilles bout à bout, donnant l'aspect d'un petit filament plus ou moins incurvé.

On n'observe pas de formes monstrueuses, et le microbe reste en somme très identique à lui-même dans les différents milieux. Dans le lait ou le petit-lait il a parfois un aspect granuleux, qui le fait ressembler au bacille de la tuberculose, dont le rapprochent d'ailleurs sa forme et ses dimensions.

Il est moins délicat que le streptobacille, et se conserve beaucoup plus longtemps dans les milieux artificiels. Il ne produit pas de spores. Indifféremment aérobie ou anaérobie, il partage avec le streptobacille la propriété de ne pousser que sur des milieux sucrés.

Comme lui il garde le Gram tant qu'il est vivant, et le perd sitôt qu'il est mort. Les éléments individuels paraissent mourir assez vite, mais les colonies mettent longtemps à épuiser les ressources nutritives des milieux. Aussi peut-on voir sur des préparations de colonies relativement jeunes (48 à 72 heures) des éléments tout à fait incolores à côté de bacilles bleu foncé.

Sur la surface de la gélose lactosée ou glucosée, les colonies apparaissent au bout de 24 heures d'étuve sous forme de petits points transparents, presque incolores, en goutte de rosée, et au bout de 48 heures elles ont pris leur aspect caractéristique : ce sont alors, vues par réflexion, des taches convexes, d'un blanc transparent très légèrement jaunâtre, à bords nettement circulaires, à surface humide et brillante. Vues par transparence, elles sont, au contraire, d'un bleu porcelainé intense et offrent souvent des irisations. L'éclat de leur surface est remarquable; il arrive que, dans certains tubes, les colonies aient toutes l'aspect qu'offrent des grains de fécule examinés à la lumière polarisée, et que l'on voie à leur surface comme une croix de Malte chatoyante. Elles atteignent et ne dépassent guère 2 à 3 millimètres de diamètre.

A un faible grossissement, les colonies très jeunes ont l'aspect de gouttes de rosée et forment de petites taches rondes, incolores, à bords parfaitement circulaires. Plus tard, elles ont une teinte jaune qui peut même devenir assez foncée et qui est surtout marquée vers le centre beaucoup plus épais. Un mince liséré incolore semble entourer ce noyau central et se limite par un rebord granuleux. Toute la surface de la colonie paraît d'ailleurs finement granuleuse. Dans le cas où l'on a l'aspect en croix de Malte décrit plus haut, on voit que les colonies ont l'air d'être composées de couches concentriques imbriquées, rappelant l'aspect d'un bulbe d'oignon coupé perpendiculairement à son axe, ou d'une coupe de grain d'amidon. Il s'agit probablement d'une déshydratation inégale des différentes zones de la colonie.

Dans la profondeur de la gélose sucrée, le bacille donne des colonies opaques, jaunâtres, sphériques ou discoïdes, à bords nets.

Lorsqu'on le sème par piqûre dans la gélatine lactosée, on voit bourgeonner tout autour du canal de piqûre une série continue de petites colonies blanches, rondes, très régulièrement disposées, et paraissant fixées au canal central comme un grain de raisin sur la grappe. Il ne se produit pas de liquéfaction.

Dans le bouillon lactosé ou glucosé, il se forme dès le 2e jour un trouble uniforme abondant, qui donne au liquide, lorsqu'on l'agite, un aspect chatoyant. Il se produit de l'acide lactique.

Il en est de même dans le petit-lait, où le bacille pousse admirablement, trouble le liquide, et donne au bout de 48 heures un abondant dépôt blanchâtre. Il y développe, en 24 heures, une acidité de 0,216 0/0 exprimée en acide lactique.

Le lait, où le microbe pousse fort bien, n'est jamais coagulé.

Il n'y a pas de développement sur pomme de terre.

§ 3. — *Diplococcus Lebenis.*

Il se présente toujours par deux. Les chaînes sont nettement composées de diplocoques, souvent en voie de division, et dont les éléments sont aplatis dans le sens de la longueur, comme le gonocoque. Les éléments sont assez gros, 1/3 μ de diamètre environ. Dans le leben, on ne trouve guère que des diplocoques; mais dans les cultures pures, sur lait, on trouve déjà de courtes chaînes.

Dans le petit-lait, les chaînes peuvent devenir très longues : nous en avons compté de plus de cent éléments.

Le diplocoque se colore bien par toutes les couleurs d'aniline et reste d'un beau bleu-noir après la réaction de Gram. Mais les éléments morts se décolorent par cette réaction.

Sur la gélose lactosée, les colonies apparaissent au bout de 24 heures sous forme de gouttelettes un peu aplaties, d'un blanc sale, translucides; leurs bords ne sont pas tout à fait circulaires. Elles sont souvent de taille inégale dans un même tube.

A un faible grossissement, ce sont des disques jaunâtres, à surface un peu villeuse, sans rien de bien caractéristique. Les colonies un peu vieilles sont plus foncées, presque brunes, et ont des contours plus flous; elles ont un aspect spongieux.

Dans la profondeur de la gélose sucrée, les colonies représentent de petites sphères blanches, à surface lisse, opaques.

Dans la gélatine lactosée, par piqûre, la culture se fait mal et son développement s'arrête au bout de peu de jours. Le long du canal de piqûre s'échelonnent, séparées par de petits intervalles, de très petites colonies rondes, blanches par réflexion, brun sombre par transparence, à bords parfaitement nets. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Dans le bouillon sucré, il se fait un développement abondant et rapide; le liquide se trouble, et un précipité granuleux, cohésif, d'un blanc grisâtre, se dépose au fond du tube.

Il pousse également bien dans le petit-lait, et il y développe des matières volatiles à odeur de fromage, ainsi que de l'acide lactique (0,396 0/0 en 24 heures).

Le lait est rapidement coagulé. Le microbe, comme le streptobacille, sécrète une présure qui coagule la caséine, comme on peut s'en assurer en neutralisant l'acide lactique par du carbonate de chaux, au fur et à mesure de sa production.

Le diplocoque Lebenis ne donne pas de spores. Sa vitalité est assez grande. On peut le conserver dans du lait pendant plusieurs mois.

§ 4. — *Saccharomyces Lebenis.*

C'est une levure vraie, dont les grains de forme ovoïde ont un grand diamètre variant entre 3 et 6 μ, un double contour net, un contenu granuleux. Les éléments sont en général isolés, très rarement par deux; les bourgeons se détachent très jeunes. Nous n'avons jamais observé de formes mycéliennes. Le S. Lebenis a une longue vitalité, et nous en avons pu faire des réensemencements fertiles au bout de plusieurs mois. Nous n'avons jamais pu obtenir de spores, ni en laissant séjourner de la levure sur des filtres, ni en la cultivant sur des cylindres de plâtre.

Toutes les colorations par les couleurs basiques d'aniline réussissent. La méthode de Gram donne une belle teinte bleu foncé. La

persistance de la réaction ne nous a pas paru être aussi nettement en rapport avec la vie du microorganisme que pour les bactéries décrites plus haut.

Lorsqu'on cultive le S. Lebenis, provenant directement du leben, dans de la gélose sucrée en profondeur, il se montre aérobie strict et ne pousse absolument que dans la zone supérieure de la colonne de gélose. Nous avons vu que du lait ensemencé avec du leben et cultivé dans un tube de Pasteur bien purgé d'air à la trompe se coagule, mais que l'on n'y trouve au bout de 24 heures ni saccharomyces, ni mycoderma Lebenis. On peut ainsi se débarrasser complètement de ces deux microorganismes.

Pourtant cette aérobiose stricte n'est pas une propriété constante du Saccharomyces. Nous verrons, en effet, qu'il fait fermenter un certain nombre de sucres, et cette fermentation, ainsi qu'on pouvait s'y attendre, se produit aussi bien à l'abri qu'au contact de l'air. Si l'on resème sur gélose sucrée en profondeur de la levure venant de faire fermenter du moût de raisin par exemple, on verra les colonies de Saccharomyces se développer du haut en bas du tube : pourtant les colonies de la zone supérieure sont notablement plus grosses et plus serrées que celles de la zone privée d'air, qui forment un nuage extrêmement fin.

Le S. Lebenis pousse bien sur gélose ordinaire non sucrée. Il y donne au bout de 48 heures d'étuve de petites colonies blanches, assez transparentes, à bords nettement circulaires, à surface humide et convexe. Ces colonies n'augmentent guère de dimension dans les jours suivants, et ne dépassent pas 3 millimètres de diamètre. A un grossissement faible, elles se présentent sous l'aspect de taches jaunes, à bords parfaitement circulaires, à surface convexe finement granuleuse.

A l'intérieur de la gélose sucrée, ce sont des colonies blanches, discoïdes ou sphériques, compactes, denses, opaques, à surface parfaitement nette, qui peuvent atteindre d'assez grandes dimensions.

Dans la gélatine sucrée, il se développe, le long du canal de piqûre, un chapelet de fines colonies rondes ou ovales, étroitement serrées les unes contre les autres ; dans le haut du tube, ces colonies poussent des ramifications sous forme de houppes serrées; ces ramifications ne dépassent pas 3 ou 4 millimètres et sont fort épaisses. Il ne se produit aucune liquéfaction.

Cultivé dans du bouillon lactosé, il pousse assez bien, trouble le liquide, et se dépose dans le fond du vase, sans donner lieu à la fermentation alcoolique. Il en est de même dans le petit-lait. La levure vit dans le lait qui reste inaltéré.

Nous l'avons cultivé dans du moût de raisins secs contenant 19 gr. 0/0

de glucose, et ayant une acidité totale équivalant à 2gr,142 0/0, exprimée en acide oxalique. Il s'y développe très bien, trouble le liquide, puis se dépose abondamment au fond du vase, en donnant lieu à une effervescence très active. La fermentation paraît se faire un peu plus énergiquement à l'étuve, mais elle dure alors moins longtemps. Au bout de 36 jours à la température ambiante du laboratoire (environ 26° C.) la fermentation était généralement terminée. L'examen du moût pratiqué au bout d'un semblable délai nous a donné les résultats suivants :

Odeur agréable de fruits : le liquide s'est clarifié et sa couleur a passé du brun à un beau jaune d'or. Analyse chimique :

Glucose	0 gr. 982 0/0	
Acidité totale	0 — 49 —	en acide oxalique.
Acides fixes	0 — 46 —	id.
Acides volatils	0 — 03 —	en acide acétique.
Alcool éthylique	11° 2 —	en volume.

Si le Saccharomyces Lebenis est incapable de faire fermenter le lactose, il a pourtant la propriété de faire fermenter d'autres disaccharides, entre autres le saccharose et le maltose.

Semé dans une solution de saccharose à 10 0/0, il s'y est développé assez lentement d'abord, et n'a commencé à produire d'effervescence qu'au bout de 11 jours. Le liquide exactement neutralisé a été distillé 13 jours après ; le distillat a donné les principales réactions de l'alcool vinique (formation de cristaux caractéristiques d'iodoforme, etc....) Le milieu sucré contenait 7 gr,125 0/0 de sucre *interverti*, le reste du sucre ayant subi la fermentation alcoolique.

Notre levure intervertit donc le saccharose, mais laisse le lactose inaltéré.

Semée dans le moût de bière, elle y provoque une fermentation extrêmement énergique, et agit comme levure haute.

Pour qu'une fermentation alcoolique se développe dans des milieux lactosés où l'on a semé notre levure, il faut qu'elle s'y trouve en symbiose avec d'autres microorganismes.

Nous avons ensemencé du bouillon lactosé à 2 0/0 avec le saccharomyces et le streptobacillus, et nous avons vu se produire une fermentation très nette. Au bout de plusieurs semaines, le bouillon a été distillé après neutralisation. Traité par une solution de potasse et la liqueur iodo-iodurée, le distillat nous a donné une odeur nette et des cristaux d'iodoforme nombreux. La même expérience faite sur un bouillon où avaient poussé simultanément la levure et le *bacillus Lebenis* a donné une odeur faible d'iodoforme, mais pas de cristaux.

Enfin la réaction de Lieben et demeurée complètement négative avec du bouillon lactosé ensemencé avec le diplocoque et le saccharomyces.

C'est donc le streptobacillus et accessoirement le bacillus Lebenis qui permettent à notre levure de faire dans le lait de la fermentation alcoolique. Nous reviendrons tout à l'heure sur cette coopération.

§ 5. — *Mycoderma Lebenis.*

Les éléments se rencontrent isolés ou groupés en mycélium. Dans le premier cas, leurs dimensions oscillent entre 6 et 12 μ de longueur sur environ 3 μ de large ; dans le second, on voit les articles s'allonger et s'amincir, et atteindre 33 μ et plus sur 1,5 ou 2 μ d'épaisseur. Souvent il semble que les extrémités arrondies des individus isolés soient un peu renflées, en biscuit. Dans les arrangements mycéliens cette forme ne s'observe pas : les articles se disposent bout à bout en s'étirant pour ainsi dire, et les bourgeons latéraux donnent naissance à des chaînes secondaires se détachant à angle presque droit. Les deux aspects se rencontrent dans le leben.

Examinés vivants sans coloration, les éléments se montrent entourés d'un double contour : leur protoplasma finement granuleux contient souvent d'assez grosses vacuoles. Ils se colorent bien par les couleurs d'aniline, et conservent bien le violet après la réaction de Gram. La vitalité est grande; nous n'avons pu obtenir de spores sur cylindres de plâtre.

Vis-à-vis de l'oxygène, le M. Lebenis se comporte absolument comme le saccharomyces précédemment étudié.

Cultivé sur gélose ordinaire en surface, il donne des colonies d'un blanc grisâtre, opaques, crémeuses, peu surélevées, à surface humide. Les bords des colonies jeunes sont assez régulièrement circulaires : plus tard ils se dentèlent, en même temps qu'apparaît une sorte de stratification en zones concentriques. Les colonies, dans le même tube, atteignent des dimensions assez variables. Pourtant, c'est en moyenne l'espèce qui fournit les plus grosses colonies parmi les cinq microorganismes du leben. On en voit qui ont 6 à 8 millimètres de diamètre. Examinées à un faible grossissement, elles sont de couleur grise, plus accentuée au centre; toute la surface est villeuse, presque épineuse. Sur gélose sucrée ou lactosée, le mycoderme pousse mieux encore et donne des colonies plus grosses.

Dans la profondeur de la gélose sucrée, les colonies exclusivement aérobies prennent une couleur d'un gris verdâtre, et leur centre s'entoure d'un chevelu très ramifié, s'étendant assez loin, et que le microscope montre composé d'arborisations très élégantes.

Semé par piqûre dans la gélatine lactosée, il donne tout le long du canal un développement très abondant près de la surface, de moins en moins abondant à mesure qu'on va vers le fond, — en sorte que la culture a la forme d'un cône à base supérieure. Le long de la piqûre s'égrènent de petites colonies rondes, blanches, d'où part un chevelu ramifié très délicat qui se dirige perpendiculairement à l'axe du tube, et qui, tout à fait en haut, occupe toute la largeur de la colonne de gélatine. A la surface même de la gélatine, il se forme une sorte de couche croûteuse, mince, sèche, nacrée, beaucoup plus consistante et continue à la périphérie qu'au centre, où elle semble divisée en îlots. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Semé dans du bouillon lactosé, le mycoderme pousse assez mal, en donnant un voile très mince et transparent, grisâtre, fragile, qui s'accole aux parois du vase et que l'agitation fragmente facilement. Le liquide est légèrement troublé et il se fait un dépôt au fond du tube. Il ne se produit pas de fermentation. Il en est de même dans le petit-lait.

Dans le moût de raisins secs au contraire, la culture est active et la fermentation alcoolique manifeste ; il se produit un voile plus épais que celui des cultures en bouillon, voile duquel des masses microbiennes grumeleuses tombent peu à peu au fond du vase. Tout le liquide finit par être trouble, mais le développement le plus abondant se fait toujours à la surface, et il finit par y avoir de très gros flocons au fond du vase. La fermentation, à la température ordinaire, se poursuit pendant une quinzaine de jours environ, puis diminue beaucoup d'intensité et finit par s'arrêter.

Un moût examiné au bout de 37 jours possédait une odeur plus aigre et moins agréable que celle du moût fermenté par le saccharomyces, et était de nuance plus claire. L'analyse y décelait :

Glucose	0 gr. 67 0/0	
Acidité totale	0 — 42	— en a. oxalique.
Acides fixes	0 — 38	— —
— volatils	0 — 036	— en a. acétique.
Alcool éthylique	9 —	— en volume.

Semé dans une solution de saccharose, le mycoderme y pousse assez mal, mais n'y produit ni fermentation alcoolique, ni interversion du saccharose.

En revanche, il attaque le maltose et fait fermenter, bien que faiblement, le moût de bière.

Dans le bouillon lactosé, la présence du streptobacille, et, à un moindre degré, du bacille, permet au mycoderme de faire fermenter le sucre de lait.

IV

Ces cinq microorganismes sont-ils bien les agents de la fermentation du leben? leur action est-elle seule en jeu? Pour le prouver, il fallait fabriquer du leben au moyen de nos cultures pures, et s'assurer de l'identité de composition chimique de ce produit artificiel et du leben ordinaire.

On obtient souvent du leben qui ne diffère en rien de celui qu'on mange en Égypte en semant simplement les cinq microorganismes dans du lait bouilli ou stérilisé, et en laissant à l'étuve pendant quelques heures. Mais on n'y réussit pas toujours. Il arrive que les bactéries coagulantes se développent trop vite et trop abondamment, par rapport aux blastomycètes. Il est probable que ceux-ci, pour n'avoir pas été semés en quantité suffisante dès le début, sont englobés dans les flocons de caséine et que la fermentation alcoolique s'en trouve gênée.

Pour agir à coup sûr, on peut semer d'abord dans le lait les deux blastomycètes avec le bacillus Lebenis, qui rend possible la fermentation, sans coaguler la caséine. On sème ensuite le streptobacille et le diplocoque, lorsque les premiers microorganismes ensemencés ont eu le temps de se développer. De cette façon, l'équilibre microbien s'établit plus aisément et chacun des agents de fermententation se développe selon la proportion la plus favorable.

Il se produit là quelque chose d'analogue à ce que l'on observe dans la fabrication artificielle de kéfir dont la fermentation a tant d'analogie avec celle qui fait l'objet de ce travail. Freudenreich [1], qui a fait récemment du kéfir une étude bactériologique approfondie, explique par des raisons semblables aux nôtres les échecs fréquents, surtout au début, qu'il rencontra en ensemençant du lait avec des cultures pures de ferments de kéfir.

Nous avons montré que le streptobacille et le diplocoque, tout ferments lactiques qu'ils sont, n'en sécrètent pas moins une présure, et qu'ils sont donc à la fois ferments du lactose et ferments de la caséine. Nous n'avons pu isoler cette présure. Nos essais nous ont montré qu'elle se laisse arrêter par les filtres poreux,

1. Ed. V. Freudenreich, Bacteriologische Untersuchungen über den Kéfir, *Centralblatt f. Bacteriologie*. II Abth., 1897 N° 2 et suiv.

et nous n'avions pas à notre disposition d'autres moyens pour chercher à l'isoler. Mais sa présence est attestée par les expériences que nous avons rapportées plus haut. Freudenreich avait montré déjà que certains ferments lactiques sécrètent de la caséase. Nos recherches établissent qu'il existe aussi des microorganismes capables de faire subir au lactose la fermentation lactique, tout en sécrétant une présure, fait que l'on n'avait pas, croyons-nous, constaté jusqu'ici. D'autre part, contrairement à la règle ordinaire, nos bactéries présurantes ne sécrètent pas de caséase.

Les modifications chimiques subies par le lait sous l'action des ferments du leben sont donc très analogues à celle qu'il subit dans l'estomac du nourrisson, où il se coagule sous la double influence des acides et de la présure.

Mais il s'y ajoute une autre action, dont la résultante est la production d'alcool. Si notre saccharomyces et notre mycoderme faisaient subir au lactose la fermentation alcoolique, le problème serait par là même résolu. Mais nous avons vu qu'il n'en est rien. Nos deux blastomycètes font fermenter le glucose et le maltose, mais non pas le lactose. Notre saccharomyces est même capable d'intervertir le saccharose, pour faire ensuite fermenter le glucose ainsi obtenu. Mais il laisse le lactose inaltéré.

En présence du streptobacille, au contraire, nos deux blastomycètes produisent dans un milieu lactosé la fermentation alcoolique. Freudenreich avait de même isolé dans le kéfir une bactérie (streptococcus *b*) qui permet à la levure du kéfir de faire fermenter le lactose, et il suppose que le rôle de ce streptocoque consiste à dédoubler le lactose en monosaccharide. C'est là aussi l'hypothèse que nous avions faite pour interpréter l'action de notre streptobacille. Nous avons cherché à en avoir la vérification chimique et, avec l'aide de M. Gillet, pharmacien à l'hôpital des Enfants-Malades, nous avons analysé une culture pure de streptobacille dans du bouillon lactosé à 2 0/0. Après avoir déféqué le bouillon au moyen du sous-acétate de plomb, et enlevé l'excès de plomb par le carbonate de soude, nous avons traité le liquide ainsi obtenu par le chlorhydrate de phénylhydrazine en excès en liqueur acétique en présence de l'acétate de soude, au bain-marie pendant environ une heure. Si le bouillon avait contenu du glucose, le glucosazone produit, insoluble dans l'eau à chaud, se serait précipité ; mais en filtrant, et en traitant le filtrat par l'acétone

bouillant, nous n'avons pas obtenu de cristaux par l'évaporation. Dans la liqueur filtrée, devait rester le lactosazone et — par hypothèse — le galactosazone, tous deux précipitables à froid; le précipité fut repris plusieurs fois par l'eau pour le purifier et le faire cristalliser, — mais les cristaux observés étaient du lactosazone, et nous n'avons pu voir de galactosazone, même en reprenant le précipité par l'alcool étendu chaud.

Il ne nous a donc pas été possible — et l'expérience a été répétée à plusieurs reprises — de déceler d'autre sucre que du lactose dans la culture. Il est probable cependant qu'une interversion se produit, mais que les produits de dédoublement subissent aussitôt la fermentation lactique. C'est là du reste la théorie généralement adoptée de cette fermentation. On comprendrait dès lors que la levure se développant dans un milieu où se produisent ces phénomènes puisse faire subir la fermentation alcoolique à une partie du sucre interverti, alors que le reste est aussitôt converti en acide lactique par le streptobacille.

Mais s'il en est ainsi, le diplocoque qui est, lui aussi, un ferment lactique, mais qui ne rend pas le lactose fermentescible pour les levures, attaquerait le sucre de lait directement sans l'intervertir. On voit que le problème se complique singulièrement, et il paraît difficile de le résoudre en l'état actuel de nos connaissances.

D'après ce que nous avons dit des propriétés biologiques des microorganismes du leben, — on voit que le streptobacille et le diplocoque produisent de l'acide lactique et font coaguler le lait par l'action combinée de l'acide lactique ainsi produit et de la présure qu'ils sécrètent. Nous avons vu, de plus, que le streptobacille rend le lait fermentescible pour le saccharomycète et le mycoderme, qui tous deux donnent lieu à la production d'alcool et probablement de quelques autres composés moins bien définis qui contribuent à donner au caillé son arome.

Reste le petit bacille fin, bacillus Lebenis, dont le rôle ne semble pas très clair. Il donne lieu à un peu d'acide lactique, il rend le lactose fermentescible, — à un moindre degré que le streptobacille, — mais son absence dans les lebens que nous avons fabriqués artificiellement ne nous a paru entraîner aucune différence dans les propriétés du produit obtenu. Freudenreich a pu de même produire du kéfir sans l'aide du bacillus Caucasicus que

l'on trouve pourtant dans tous les échantillons de kéfir.

En terminant, nous voudrions encore rappeler cette propriété intéressante de nos bactéries, de ne pousser que sur des milieux sucrés, — propriété qu'ils partagent du reste avec les organismes du kéfir. Cet exclusivisme est le meilleur argument que l'on puisse donner en faveur de leur spécificité, — spécificité acquise par l'accoutumance prolongée à un même milieu, le lait. Il est donc très probable que la symbiose de nos cinq microorganismes remonte à une époque assez lointaine dans le passé, et que c'est au cours d'innombrables réensemencements qu'ils ont acquis quelques-unes de leurs propriétés. On connaît en effet bien peu de microorganismes aérobies pour lesquels le sucre soit une condition *sine qua non* d'existence.

SUR UN ROLE PARTICULIER

DES

HYDRATES DE CARBONE

DANS

L'UTILISATION DES SELS INSOLUBLES PAR L'ORGANISME

Par L. VAUDIN

I

Si l'on cherche dans les traités de physiologie ou de chimie physiologique, les conditions dans lesquelles les matières minérales insolubles dans l'eau sont transportées dans les liquides de l'organisme animal, à partir de leur introduction dans le tube digestif, on n'y trouve à cet égard que des renseignements incertains et vagues; parfois même cette question semble avoir été complètement mise de côté.

Que deviennent les sels insolubles après l'action du liquide salivaire, après celle du suc gastrique? Par quel mécanisme pénètrent-ils dans le sang pour compenser les pertes incessantes que ce liquide subit?

Les aliments introduits dans le tube digestif sont tout d'abord soumis à l'action de la salive mixte collectée dans la bouche. Il ne semble pas que jusqu'ici on ait pensé que, sous l'influence de cette sécrétion, les éléments minéraux puissent subir soit dans la bouche, soit pendant leur séjour dans l'estomac, une modification importante dans leur manière d'être. On a, au contraire, tout naturellement attribué la dissolution des sels insolubles, phosphates et carbonates terreux, à l'acidité du suc gastrique.

Les travaux que j'ai publiés sur les phosphates du lait, et

sur la migration du phosphate de chaux dans les plantes m'ont conduit à rechercher si la dissolution des phosphates terreux ne se faisait pas par une autre voie.

On sait que le lait contient du phosphate de chaux sous deux formes, l'une en suspension dans le liquide avec la plus grande partie des matières protéiques, l'autre en dissolution. La séparation de ces phosphates peut s'effectuer au moyen d'un tube de terre poreuse ou d'une bougie filtrante, ainsi que l'a indiqué M. Duclaux[1].

Pendant longtemps, l'opinion généralement admise était que ce sont les matières protéiques qui tiennent en dissolution les phosphates contenus dans le lait, ce n'est qu'après la découverte de l'acide citrique dans le lait que les idées se sont modifiées sur ce point.

J'ai démontré que cet acide existe dans le sérum lacté à l'état de citrates alcalins, et l'on connaît la propriété dissolvante de ces sels sur les phosphates de chaux, de fer, de magnésie, propriété journellement utilisée en chimie analytique.

En recherchant si les proportions des citrates contenus dans le lait étaient suffisantes pour maintenir en dissolution les phosphates terreux, je suis arrivé à mettre en évidence le rôle important que joue parallèlement le sucre de lait dans ce phénomène[2], en préparant des solutions de phosphate de chaux dans les citrates alcalins en présence de lactose.

Les solutions obtenues ne sont pas comparables à celles qu'on obtient en dissolvant un phosphate insoluble dans un acide, elles possèdent des propriétés particulières bien en rapport avec le rôle que les solutions naturelles remplissent physiologiquement.

Chauffées vers 70-80°, elles se troublent et le précipité se redissout presque entièrement par le refroidissement; le liquide reste seulement un peu louche. Des doses faibles d'acide ou d'alcali modifient la façon dont les solutions se comportent avec la chaleur; si la réaction est trop acide, la précipitation n'a plus lieu; si elle est trop alcaline, le dépôt se forme, mais il ne se redissout pas après refroidissement.

1. Duclaux, *Le Lait*, Études chimiques et microbiologiques, 1887, page 90.
2. Vaudin, Sur le phosphate de chaux en dissolution dans le lait, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894, p. 856.

L'addition de sels, le chlorure de sodium, par exemple, détermine au bout d'un temps plus ou moins long la précipitation du phosphate de chaux ; il en est de même du sulfate de soude.

La stabilité des phosphates dissous est donc variable avec les sels en présence.

Filtrées au tube de terre poreuse, les solutions ne le traversent pas entièrement, une partie des sels est retenue, et cette proportion varie d'une opération à l'autre avec la réaction du liquide. « Il semble donc que la facilité avec laquelle les liquides considérés traversent une paroi poreuse est d'autant plus grande qu'ils sont moins acides; il en est vraisemblablement de même pour le passage à travers les membranes animales. »

Plusieurs expériences m'ont permis ensuite d'établir que les sucres jouent d'une façon générale le même rôle que la lactose.

D'autre part, j'ai fait voir que certains sels organiques alcalins, les tartrates, les malates se comportent vis-à-vis des phosphates terreux comme les citrates, mais leur pouvoir dissolvant est beaucoup moindre que celui de ces derniers.

Tous ces sels dérivent d'un acide possédant une fonction alcoolique; les sels obtenus avec les acides ayant une molécule d'eau en moins, tels que les succinates, les carballylates alcalins, n'ont aucune propriété dissolvante.

La connaissance de ces nouvelles données m'a amené à rechercher les conditions dans lesquelles s'effectue la migration du phosphate de chaux dans les plantes.

On savait depuis les beaux travaux d'Isidore Pierre que les phosphates terreux de la plante sont pour la plus grande partie transportés dans la graine au moment de la formation de cette dernière ; mais le mécanisme de cette migration était inconnu. Voici les conclusions auxquelles je suis arrivé dans ce mémoire :

...« Les sucres élaborés par les organes foliacés en se dirigeant vers la graine ainsi que les phosphates et les malates alcalins, entraînent avec eux les phosphates insolubles ; au fur et à mesure de leur transformation en amidon, ils déposent du sel tribasique de chaux; en même temps, les malates sont détruits en presque totalité ; une partie seulement subit une destruction incomplète et persiste dans la graine à l'état de succinates.

« Des phénomènes semblables se produisent sans aucun doute chez toutes les plantes dont les graines renferment de

l'amidon; les sucres, les sels à acides organiques fixes, malates, citrates... qui concourent à ce transport, peuvent varier, mais le fait reste le même, et semble avoir un caractère général en physiologie végétale[1]. »

Je me suis demandé s'il ne se produisait pas des phénomènes analogues par la saccharification de l'amidon dans la bouche ou dans l'estomac.

II

DE LA DISSOLUTION DES SELS TERREUX PENDANT LA SACCHARIFICATION DES MATIÈRES AMYLACÉES PAR LA SALIVE.

Pour savoir si l'acide chlorhydrique sécrété par l'estomac est le dissolvant des sels terreux, et si cette dissolution est indépendante de l'action salivaire, j'ai fait l'expérience suivante :

On place dans un bain-marie, à 37°-38°, deux vases contenant l'un du pain insalivé et délayé dans l'eau, l'autre du pain divisé dans une quantité équivalente d'eau acidulée par l'acide chlorhydrique à 0,2 °/₀. Après deux heures de digestion, on filtre les liquides dans le vide à travers des tubes de terre poreuse.

Le premier liquide filtré est de beaucoup le plus abondant, sa couleur est jaune ambrée légèrement fluorescente, et il ne se colore pas par l'iode. Sa densité est égale à 1042, et il laisse à l'évaporation un poids d'extrait égal à $107^{gr},80$ par litre. La proportion de cendres insolubles par litre est égale à 0 gr. 94.

Le second liquide a un volume à peine moitié moindre, il est peu coloré et donne avec l'iode une coloration bleu intense; sa densité est égale à 1010 et il abandonne à l'évaporation un poids d'extrait égal à $18^{gr},15$ par litre. La proportion de cendres insolubles par litre est égale à $0^{gr},46$.

Ces deux essais sont significatifs; ils montrent que le liquide obtenu sous l'influence de la salive seule contient plus du double de matières minérales insolubles que le liquide acide filtré. On pourrait donc prendre ces résultats comme définitifs, mais il

1. Vaudin, Sur la migration du phosphate de chaux dans les plantes, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895, p. 636.

m'a paru que des expériences effectuées dans d'autres conditions de milieu, avec des points de comparaison plus précis, nous conduiraient à des conclusions plus certaines ; aussi, j'ai fait une nouvelle série d'essais en notant toutes les circonstances qui pouvaient influencer les résulats.

***

Le pain employé dans cette expérience est bien cuit, il perd à l'étuve à 100°,33, 4 % d'eau.

300 grammes de ce pain sont divisés en tranches qu'on saupoudre avec du chlorure de sodium pur; on le mâche longuement et, ensuite, on le dégurgite dans des vases tarés. Ce travail, effectué par des jeunes gens dont la salive est riche en ferment, est fort désagréable; c'est pour le rendre moins pénible et faciliter le rejet de la bouillie obtenue qu'on ajoute du sel pour favoriser la sécrétion des glandes salivaires. L'opération dure une demi-heure environ; les vases sont immédiatement pesés et le contenu délayé dans une quantité suffisante d'eau distillée pour obtenir 1,500 c. c. Le produit est divisé en trois portions de 500 c. c. La première (A) ne subit aucune addition, elle contient :

Pain		100 grammes.
Salive		120 — [1]
Eau distillée	Q. s. pour	500 c. c.

La seconde (B) est additionnée de 0gr,50 d'acide chlorhydrique, soit 1 gramme par litre.

La troisième (C) est additionnée de 1 gramme d'acide chlorhydrique, soit 2 grammes par litre.

Toutes ces manipulations se font le plus rapidement possible et les trois flacons contenant les liquides A, B, C, sont maintenus dans le même bain-marie à une température de 38° à 40° pendant 2 heures, pendant lesquelles on agite fréquemment. Après ce temps, on retire les flacons, on les laisse refroidir, et on filtre dans le vide au tube de terre poreuse.

Les propriétés respectives des liquides recueillis sont les suivantes :

1. La salive totale sécrétée est de 360 grammes.

A. — *Liquide filtré provenant de l'insalivation simple.*

Liquide de couleur jaune ambrée légèrement fluorescente, ne se colorant pas par l'iode :

Densité	1048 à + 15°
Acidité	0,12 par litre

en prenant pour témoin la phtaléine du phénol et en l'évaluant en acide chlorhydrique.

Sucre produit évalué en maltose :

73 gr. 15 par litre.

Précipité très peu abondant par l'alcool à 95°.

Les cendres insolubles ont été dosées sur 50 c. c. de liquide filtré. La masse desséchée au bain-marie et à l'étuve à air chaud est chauffée avec précaution, car elle se boursoufle et a une tendance à monter au-dessus des bords de la capsule. Finalement, lorsqu'il ne se dégage plus de fumée, le charbon obtenu est léger et friable; on le lave à cinq ou six reprises à l'eau distillée bouillante. Le charbon est recueilli sur un filtre, séché, calciné, et les cendres sont pesées. Dans le cas présent, le poids est de $0^{gr},049$ pour 50 c. c., soit de $0^{gr},98$ de cendres insolubles par litre dans les conditions particulières de l'expérience.

B. — *Liquide insalivé additionné de 1 gramme d'acide chlorhydrique par litre.*

Le liquide est limpide et tout à fait comparable à celui qui a été examiné en A.

Ses caractères sont les suivants :

Densité à + 15°	1048
Acidité évaluée en HCl	0,18
Sucre formé (maltose)	77 gr. 04
Cendres insolubles	0 gr. 96

L'alcool à 96° donne dans le liquide un précipité insignifiant.

Pas de coloration par l'iode.

C. — *Liquide insalivé additionné de 2 grammes d'acide chlorhydrique par litre.*

Le produit est moins coloré qu'en A et en B, il se colore en

brun par l'iode et il fournit un précipité notable quand on le traite par l'alcool.

Voici les autres données qui ont été trouvées en opérant comme ci-dessus :

Densité	1039 à + 15°
Acidité évaluée en HCl.	0,46
Sucre formé (maltose)	41 gr. 65
Cendres insolubles	0 gr. 74

Avant de dégager ce qui découle de l'examen de ces résultats, suivons, phase par phase, les opérations qui ont été faites parallèlement dans des conditions identiques à tous les points de vue, sauf en ce qui concerne la réaction du milieu.

L'insalivation a duré environ une demi-heure, et, pendant ce temps, la totalité du pain mis en expérience n'a subi l'action que de la diastase salivaire. Après l'addition d'eau distillée et la répartition en trois parts, les portions B et C reçoivent les quantités d'acide chlorhydrique indiquées; or, on sait que chacune contient 120 grammes de salive. Une telle quantité de salive neutralise un poids relativement élevé d'acide chlorhydrique. Chittenden et Smith[1] ont vu, en effet, que 20 c. c. de salive déjà neutralisée au tournesol contenaient des matières protéiques capables d'absorber près d'un centigramme d'acide chlorhydrique; si, d'autre part, nous tenons compte de la quantité d'acide fixée par les matériaux azotés du pain, nous voyons pourquoi l'acidité des milieux A et B, ou, pour mieux dire, l'acide correspondant à la quantité de soude ajoutée pour influencer la phtaléine, diffère seulement par litre de quelques milligrammes.

Les faits changent si l'on considère ce qui se passe en C. Cette portion reçoit en une seule fois deux grammes d'acide chlorhydrique par litre. Une grande partie est fixée comme dans la portion voisine ; mais l'excès reste à l'état libre et empêche bientôt le ferment salivaire de continuer la saccharification commencée.

En résumé, l'action seule de la salive, sans aucune intervention du suc gastrique à réaction acide, a provoqué, dans l'expérience A, la formation d'une quantité de maltose égale à 73 gr. 15

1. Chittenden et Smith, *Loc. cit.*

par litre, et, parallèlement, 0 gr. 98 de sels insolubles dans l'eau sont entrés en dissolution dans le liquide sucré produit.

Quand on ajoute au pain insalivé des quantités variables d'acide, l'hydrolysation des matières amylacées, et la dissolution des sels terreux s'effectuent quand la proportion d'acide est peu élevée; si cette proportion est suffisante pour entraver l'action du ferment, la dissolution des sels est aussitôt arrêtée. C'est ainsi que dans l'expérience C, la teneur de ces derniers est de 25 0/0 plus faible que dans les autres essais.

*
* *

J'ai pu mettre directement en évidence, dans l'expérience suivante, la dissolution des sels terreux, parallèle à l'hydrolysation de l'amidon.

On prépare une solution de phosphate tribasique de chaux avec des citrates alcalins et du lactose ; à cette solution on ajoute de l'empois d'amidon assez fluide, et on traite le mélange par environ 2 volumes d'alcool à 95°. Il se forme un abondant précipité composé d'amidon cuit et de phosphate de chaux. Ce précipité est recueilli sur un filtre, lavé avec de l'alcool à 70° et séché. Comme il adhère fortement au filtre, on divise ce dernier en menus fragments et on le délaye dans l'eau distillée, puis on y ajoute de la salive neutralisée par l'acide chlorhydrique.

Le tout est porté au bain-marie à 40° pendant 2 ou 3 heures; au bout de ce temps, on filtre.

Le liquide filtré, précipite nettement par le nitrate d'urane et par l'oxalate d'ammoniaque en milieu acétique, il renferme donc de l'acide phosphorique et de la chaux; on l'évapore à siccité et on incinère le résidu. Le poids des cendres obtenues est de 0,037 pour 70 c. c. de liquide mis en expérience, soit de 0 gr. 054 pour 100 c. c.

Ces cendres ont une réaction alcaline très nette, il y a donc un excès de chaux par rapport à l'acide phosphorique; c'est du reste ce que démontre l'analyse qui indique la composition suivante :

Acide phosphorique	0,010
Chaux	0,027

La quantité de chaux est supérieure à celle nécessaire pour fournir avec l'acide phosphorique du phosphate tribasique.

J'ai renouvelé cette expérience en faisant varier les conditions; par exemple, en mélangeant simplement du phosphate de chaux précipité et lavé, de l'empois d'amidon et de la salive neutralisée ; le poids des matières minérales dissoutes a toujours été plus faible. Diverses causes, sans doute, contribuent à amener ce résultat; l'état physique du phosphate précipité n'est pas le même, les rapports avec les matières amylacées, la proportion de salive, sa richesse en diastase ont changé; il n'y a donc rien d'étonnant à ce que le poids des substances dissoutes varie d'une expérience à l'autre.

Ce qu'il faut retenir de ces essais, c'est que l'on peut mettre nettement en évidence la dissolution des sels terreux, parallèlement à l'hydrolysation de l'amidon, en se plaçant dans les conditions que nous avons indiquées ci-dessus.

SÉRUM NORMAL DANS LA PNEUMO-ENTÉRITE

Par S. SALTYKOW

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Un mémoire de M. Voges, sur les bacilles de la septicémie hémorragique [1], mentionne entre autres faits intéressants, une propriété du sérum normal jusqu'alors inconnue.

Il s'agit précisément de la conclusion suivante (p. 222) : une dose de 0,1 c.c. de sérum d'un cobaye normal, injectée sous la peau d'un autre cobaye, le préserve contre les résultats d'une injection sur la même place d'une dose 1000 fois mortelle d'une culture des bacilles de la pneumo-entérite des porcs (*Schweineseuche, Schütz*). D'autre part, la même injection de sérum préserve le cobaye contre une dose 50 fois mortelle de la culture mentionnée injectée dans le péritoine [2].

Cette assertion paraît peu vraisemblable *a priori*. Or, si elle était confirmée, elle serait d'une grande importance pour la doctrine de l'immunité. J'ai donc accepté avec empressement la proposition de M. Metchnikoff d'entreprendre dans son laboratoire de nouvelles recherches sur les faits indiqués par M. Voges.

J'ai cherché à suivre dans mes expériences la technique décrite par M. Voges, le plus exactement possible.

J'ai donc commencé par augmenter la virulence de ma culture de la pneumo-entérite des porcs, en la faisant passer par une série de cobayes. J'ai observé durant cette opération un fait contradictoire aux résultats de M. Voges. Cet auteur parle d'une dose mortelle ($0^{mgr},01$), supposée toujours la même, que l'injection soit faite dans le péritoine ou sous la peau. Quant à moi, j'ai trouvé dans ce dernier cas que la dose mortelle était au moins 200 fois plus forte que la dose mortelle

1. Voges, Kristische Studien und experimentelle Untersuchungen über die Bacterien der hämorrhagischen Septicämie und die durch sie bewirkten Kranheitsformen, *Zeitschr. f. Hyg. u. Infectionskrankheiten*, Bd. 23.

2. Des résultats semblables ont été obtenus avec d'autres espèces de bacilles de la septicémie hémorragique.

péritonéale. Aussi ai-je bientôt abandonné les expériences d'injection de la culture sur la même place que celle du sérum, les doses mortelles sous-cutanées étant toujours très grandes. De plus, je n'insistai pas sur ces expériences, car M. Voges, lui-même, ne leur attribuait point une importance décisive.

Mes expériences d'injection de la culture dans le péritoine ont donné également des résultats négatifs. Il arrivait toujours que, si la dose était mortelle, les animaux en expérience mouraient en même temps ou même plus tôt que les témoins.

L'injection de la culture s'effectuait 24 heures après celle du sérum, comme le faisait aussi M. Voges.

Les résultats de mes observations peuvent être groupés dans les deux tableaux suivants. Dans les expériences du premier tableau, je me suis servi d'une culture moins virulente que celle de M. Voges, la dose mortelle péritonéale étant 0mgr,5 [1]. C'est pourquoi les doses absolues devaient être plus fortes que celles de M. Voges. Quant aux expériences comprises dans le second tableau, la culture était de la même virulence que celle de M. Voges, la dose mortelle péritonéale étant 0mgr,01.

TABLEAU I

Nº du cobaye en expérience.	Nº du cobaye témoin.	POIDS en grammes.	QUANTITÉ de sérum injecté sous la peau de la nuque en c. c.	DOSE de culture de 24 h. injectée dans le péritoine en mgr.	RÉSULTAT
1	—	390	0,2	,5	Mort dans 24 h.
—	1	360	—	0,5	Resté vivant.
2	—	335	0,2	1,0	Mort dans 7 h.
—	2	360	—	1,0	Resté vivant.
3	—	415	0,2	2,0	Mort dans 24 h.
—	3	410	—	2,0	Mort dans 24 h.
4	—	435	0,2	3,0	Mort dans 24 h.
—	4	410	—	3,0	Mort dans 24 h.

1. Un milligramme de la culture dont je me suis servi correspondait à une anse.

TABLEAU II

Nº du cobaye en expérience.	Nº du cobaye témoin.	POIDS en grammes.	QUANTITÉ du sérum injecté sous la peau de la nuque en c. c.	DOSE de culture de 24 h. injectée dans le péritoine en mgr.	RÉSULTAT
5	—	355	0,5	0,05	Mort dans 12 h.
—	5	340	—	0,05	Mort dans 24 h.
6	—	320	0,5	0,5	Mort dans 24 h.
—	6	325	—	0,5	Mort dans 24 h.

Mes résultats sont complètement contradictoires avec ceux de M. Voges; je ne suis donc pas en état de confirmer ces derniers. Je suis porté plutôt à croire qu'il s'agit dans les faits de M. Voges d'une propriété individuelle et accidentelle du sérum. Cette hypothèse a été formulée, d'ailleurs, par M. Voges lui-même.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

16me ANNÉE FÉVRIER 1902 N° 2

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Pseudotuberculose streptobacillaire du surmulot.

(Mus decumanus.)

PAR J. SABRAZÈS, DE BORDEAUX.

La pathologie des muridés est à l'ordre du jour, depuis que l'on connaît le rôle joué par ces rongeurs dans la propagation de la peste. Trouve-t-on des rats morts à fond de cale, dans un port de commerce faisant le transit avec les pays où la peste est endémique, et les organes de ces rats sont-ils parsemés d'abcès miliaires, l'idée de manifestation pesteuse vient à l'esprit. Or il faut bien savoir que le bacille de Yersin n'est pas le seul microorganisme susceptible de déterminer des lésions de cet ordre chez les muridés; des souris, un rat blanc de laboratoire ont été trouvés porteurs de lésions analogues sans qu'on ait pu incriminer la peste : il s'agissait de pseudotuberculose streptobacillaire ainsi qu'en témoignent les relations de Kutscher[1], Galli-Valerio[2], Bongert[3].

Ce sont des cas semblables que nous avons observés chez le rat d'égoût, rat gris ou surmulot (*mus decumanus*[4]).

1. KUTSCHER. Ein Beitrag zur Kenntniss der bacillären Pseudotuberculose der Nagethiere (*Zeitschrift für Hygiene und Infectionskr.*, 1894).

2. BR. GALLI-VALERIO. *Le neoformazioni nodulari nell' organismo dell' Uomo el degli animali domestici* (Parma, 1897).

Études sur les néoformations nodulaires; la pseudotuberculose bactérienne des cobayes (*Arch. de parasitologie*, 1901.)

3. BONGERT. Corynethrix pseudotuberculosis murium (*Zeitschrift für Hyg. und Infectionskr.* 1901).

4. Voici quels sont les caractères différentiels du surmulot et du rat noir :

Rat surmulot, *Mus decumanus Pallas*, vulgairement rat gris, rat d'égoût : pelage blanc-roussâtre ou gris-noirâtre en dessus, blanchâtre ou cendré clair en

Le bacille de Yersin et les streptobacilles de la pseudotuberculose des rongeurs sont loin, du reste, de représenter à eux seuls tous les agents de la pathologie microbienne des diverses espèces du genre rat; qu'il nous suffise de citer le *bacillus murisepticus* R. Koch [1] de la septicémie des souris, le *bacillus typhi murium* Lœffler [2], les bacilles de Danysz [3], de Laser [4], de Mereshkowsky [5], de B. Issatschenko [6], le microbe de la peste proprement dite des rats, microbe qui ne se confondrait pas, d'après A. Edington [7], avec celui de la peste bubonique.

Un surmulot, capturé à l'hôpital Saint-André de Bordeaux en mai 1900, est intoxiqué, le lendemain de sa prise au piège, par ingestion de minium incorporé à de l'essence de térébenthine; il succombe sous nos yeux, au bout de quelques heures, et son autopsie immédiate révèle, en outre d'altérations gastro-intestinales imputables à la substance toxique, des lésions suppuratives, d'aspect fibro-caséeux, exclusivement limitées au foie et aux poumons. Sous la capsule de Glisson on voit une granulation lenticulaire, remplie de pus blanc grisâtre; à la surface des deux poumons, des collections purulentes d'aspect pustuleux, bombant sur la plèvre, des cavernules remplies d'un pus concret jaune verdâtre, des stries grisâtres, sortes de traî-

dessous. Tête et corps : 0m,25; queue : 0m,18, soit un peu moins longue que le corps. Beaucoup de sujets atteignent une plus forte taille.

Rat noir, *Mus rattus Linné :* parties supérieures noirâtres, sans mélange de roussâtre; parties inférieures d'un gris noirâtre (cendré foncé). Tête et corps : 0m,20; queue : 0m,22, c'est-à-dire plus longue que le corps.

1. R. Koch. *Ueber die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten*, 1878.

2. Loeffler. Ueber Epidemien unter den im hygienischen Institute zu Greifswald gehaltenen Mäusen und über die Bekämpfung der Feldmausplage. (*Centralbl. für Bakt.*, 1899.)

3. Dainysz. Emploi des cult. artif. de microbes pathog. à la destruction des rongeurs (*C. R. de l'Ac. des sc.*, 1893). — Un microbe pathogène pour les rats (*Mus decumanus* et *mus rattus*) et son application à la destruction de ces animaux (*Annales de l'Institut Pasteur*, avril 1900).

4. Laser. Ein neuer für Versuchsthiere pathogener Bacillus aus der Gruppe der Frettchen-Schweineseuche (*Centralbl. für Bakt.*, 1892).

5. Mereshkowsky. Zur Frage über die Virulenz des Löffler'schen Maustyphusbacillus (*Centralbl. für Bakt.*, 1894). — Ein aus Ziegelmaüsen ausgeschiedener und zur Vertilgung von Feld, — resp. Hausmäusen geeigneter Bacillus (*Centralbl. für Bakt.*, 1895).

6. B. Issatschenko. Ueber einen neuen für Ratten path. Bacillus (*Centralbl. für Bakt.*, 1898). — Untersuchungen mit dem für Ratten pathogenen Bacillus (*Centralblaff für Pakt.*, 1902.

7. A. Edington. Vorläufige Mitteilung über eine Krankheit der Ratten in Kapstadt (*Centralbl. f. Bakt.*, 1901).

nées purulentes entourées d'un liseré brun rougeâtre. La plèvre pariétale montre, des deux côtés, un semis de grains purulents d'un gris jaunâtre. Il existe des adhérences des deux feuillets pleuraux, adhérences plus marquées à gauche. L'examen des autres organes ne révèle rien d'anormal. L'affection suppurative était cantonnée à l'appareil pleuro-pulmonaire et commençait à envahir le foie.

Le pus compact, crémeux, provenant de ces lésions, se laisse écraser facilement. Il ne contient ni bacilles de Koch, ni champignon actinomycosique, ni levures, ni mucédinées, ni parasites animaux. Il recèle de très nombreux bâtonnets (fig. 1 Gr. = 600) longs de 8 à 11 μ, grêles (0,μ35 environ d'épaisseur), un peu effilés, onduleux, non ramifiés, immobiles, placés parfois bout à bout, avec des segments intercalaires souvent inégaux. Ces bâtonnets ne restent colorés ni par le Ziehl-Neelsen ni par le Gram; il ne se teignent pas en brun acajou par l'iode; tous les colorants basiques les mettent en évidence[1].

Ensemencé sur gélose, ce pus a fourni des cultures pures du bâtonnet trouvé en si grande abondance dans les préparations : semis de colonies rondes, un peu jaunâtres par transparence, plates, mesurant en moyenne, à l'acmé de leur croissance, un millimètre de diamètre.

Ces colonies sont formées de bacilles (fig. 2 Gr. = 600) juxtaposés, enchevêtrés, coudés ou disposés bout à bout, d'aspect granuleux à un fort grossissement, de longueur variable (2 à 9), d'épaisseur oscillant entre 0μ,3 et 0μ,4. Pas de sporulation. Pas de cils.

Transporté en strie sur gélose, à la température de 37°, ce microbe forme une traînée transparente, de la couleur du milieu, à surface un peu chagrinée, à bords sinueux, légèrement surélevés, limités par un double contour plus ou moins marqué. Même aspect sur gélose glycérinée et sur sérum coagulé. Pas de liquéfaction de la gélatine.

Le bouillon de bœuf peptonisé se trouble quelques heures après l'ensemencement; sa réaction reste alcaline; pas de production d'indol. Le bouillon ne tarde pas à se couvrir d'une membrane mince qui se fragmente ultérieurement : le milieu

1. Ce cas a fait l'objet d'une communication préliminaire à la Société linnéenne de Bordeaux (1900) en collaboration avec notre élève, M. Mathis, qui nous a aidé dans l'exécution matérielle de nos recherches.

exhale alors une odeur de colle forte de menuisier et il s'y précipite des phosphates; puis les débris pulvérulents de la membrane tombent au fond du tube et le liquide se clarifie au-dessus. Dans le bouillon lacto-carbonaté, trouble uniforme avec rudiment de voile; pas de fermentation.

Sur pomme de terre, croissance lente et médiocre (traînée blanc grisâtre.)

Le lait n'est pas coagulé.

L'anaérobiose est très défavorable à ce bacille. A 37°, les réensemencements doivent se répéter tous les huit jours environ pour être fertiles.



Fig. 1. Fig. 2. Fig. 3

L'examen microscopique des cultures, dans le bouillon peptonisé (fig. 3 Co = 600), est très caractéristique : filaments immobiles, longs et sinueux, composés de chaînes de bâtonnets inégaux, soit cocco-bacillaires, soit formés de segments de 5 à 60µ sur 0µ,40. Ces filaments discontinus ne sont pas ramifiés; sur leur parcours apparaissent, dans les vieilles cultures, des renflements en boule. On n'observe pas de formation de spores.

Les foyers suppuratifs, constatés à l'autopsie du surmulot, intéressent les plèvres et les poumons ; il en est qui pénètrent dans le parenchyme pulmonaire à une profondeur de 2 à 3 millimètres; d'autres, exclusivement pleuraux, sont enkystés dans une coque fibreuse infiltrée d'ectasies sanguines, parfois décollée partiellement. Autour des abcès, le poumon est extrêmement congestionné et présente des lésions de broncho-

neumonie chronique et d'emphysème. Les parties abcédées sont formées d'exsudats coagulés, de détritus nucléaires, de bactéries ; on n'y trouve pas de fibrine à l'état fibrillaire. Autour des abcès sont accumulés des leucocytes polynucléés, des cellules lymphocytoïdes, des Mastzellen en assez grand nombre, quelques cellules contenant des particules anthracosiques, des cellules conjonctives, de volumineux éléments soit mononucléés — avec un gros noyau muni d'un à trois nucléoles, situé au centre d'un protoplasma vésiculeux ou grossièrement aréolaire ; — soit en voie de karyokinèse, soit déjà divisés, ces éléments dérivent de l'épithélium alvéolaire. Il n'existe, dans ces coupes, ni cellules éosinophiles, ni follicules tuberculeux. Dans les abcès et dans le tissu inflammatoire qui les circonscrit on voit un très grand nombre de bactéries ; elles ne se laissent pas colorer par le procédé de Gram, même avec la modification de Kutscher (violet de gentiane aniliné et phéniqué); elles ne résistent pas non plus à l'action décolorante de l'huile d'aniline dans la méthode de Weigert : sur les préparations ainsi obtenues, ces bactéries se détachent, surtout à un éclairage artificiel, en rouge pâle, très inégalement imprégnées par l'éosine employée comme colorant de fond. Ces bactéries sont extracellulaires. Sur les coupes colorées par le bleu polychrome, par la thionine, par le bleu de méthylène-éosine-méthylal, elles apparaissent en violet ou en bleu pâle : ce sont des filaments streptobacillaires dont les segments ont des longueurs variables, tantôt ovoïdes (0μ,6 à 0μ,8), tantôt en bâtonnets (2 à 12μ), tantôt résultant de la disposition bout à bout de ces divers types morphologiques. Ces filaments plus ou moins longs (10 à 40μ) décrivent des flexuosités, des coudures, s'intriquent en amas broussailleux, mais ils n'ont aucune tendance à former des colonies radiées et ils ne montrent pas d'expansions en massue.

Dans le courant du même mois, un autre surmulot de même provenance présentait une petite collection purulente analogue aux précédentes, émergeant de la surface du foie ; tous les autres organes étaient indemnes.

Le microorganisme que nous avons isolé des lésions suppu-

ratives du surmulot fait manifestement partie du groupe actuellement bien connu des agents de la pseudo-tuberculose streptobacillaire, agents qui, bien que n'étant pas strictement réductibles à un seul et même parasite, sont morphologiquement et biologiquement très voisins. On trouvera dans les travaux d'ensemble de Hugo Preisz [1] et de Galli-Valerio [2] sur ce sujet, des essais de classification de ces micro-organismes qui ont été rencontrés chez l'homme, le cobaye, le lapin, le lièvre, la souris, le rat blanc, les bovidés, le mouton, le cheval, le porc, la poule, le pigeon, le chat, et dont le degré de virulence varie beaucoup avec les espèces animales qui les hébergent.

Le bacille extrait par nous des abcès de la pseudotuberculose du surmulot se rapproche de ceux que Kutscher et Bongert ont retiré de lésions similaires chez la souris. Le bacille isolé par Br. Galli-Valerio a fait l'objet d'une étude trop sommaire pour que nous puissions nous en occuper ici.

L'inoculation sous-cutanée à la souris blanche d'un bouillon de culture du bacille provenant du premier surmulot a déterminé une infection généralisée rapidement mortelle.

Le cobaye et le lapin ont résisté dans ces conditions ; ils n'ont eu qu'un empâtement local et une adénite transitoires.

Par contre, deux surmulots adultes, inoculés par pulvérisation, ont succombé à une pseudotuberculose streptobacillaire généralisée. Voici la relation d'une de ces expériences :

Des cultures sur gélose à 37°, datant de 48 heures, émulsionnées dans de l'eau stérilisée, sont projetées tous les deux jours en pluie fine sur le museau d'un gros surmulot, tout à fait normal, isolé dans une cage.

Au bout de 26 jours, l'animal succombe : il porte depuis une semaine sur la partie antéro-latérale droite du thorax, en regard du sternum, un abcès sous-cutané du volume d'un haricot, rempli de pus compact de couleur blanc jaunâtre. Les deux plèvres sont enflammées et contiennent un exsudat séro-purulent et hémorragique avec pseudomembranes tapissant le

1. H. Preisz. Recherches comparatives sur les pseudotuberculoses bacillaires et une nouvelle espèce de pseudotuberculose (*Annales de l'Institut Pasteur*, 25 avril 1894).

2. Galli-Valerio, *Loc. cit.*

diaphragme. Les deux poumons sont hépatisés. Le cœur est rétracté en systole. Une collection purulente relie le lobe gauche du foie à la paroi abdominale. Le foie est parsemé de saillies mamelonnées d'un blanc jaunâtre qui correspondent à autant d'abcès parenchymateux plus ou moins confluents. Le ligament gastro-hépatique est infiltré de pus. Autour de l'intestin grêle, immédiatement au-dessous du foie, se trouve un gâteau purulent faisant corps avec la paroi de l'intestin, sans ulcération marquée de la muqueuse. La rate volumineuse, de couleur chair musculaire, est criblée de petits abcès; elle est accolée à la paroi thoracique par l'intermédiaire d'un foyer purulent. Les ganglions mésentériques sont volumineux. Dans les reins on voit des stries purulentes, brunâtres, sous-capsulaires. Dans l'épididyme, du côté droit, se trouve un abcès de la grosseur d'une noisette. Sur le membre postérieur gauche, abcès prétibial. Les centres nerveux sont indemnes ainsi que le cœur. A l'exploration de la cavité bucco-pharyngée et de l'estomac, pas de lésions ulcéreuses. Ces abcès ressemblent point par point à ceux que nous avons décrits plus haut; tous contiennent en grand nombre les micro-organismes filamenteux et streptobacillaires inoculés dont nous avons obtenu facilement des rétrocultures.

Ce bacille, primitivement très virulent pour le surmulot, s'est ensuite progressivement atténué.

Comme le bacille de Kutscher et à l'encontre de celui de Bongert, le nôtre, dans le pus des abcès, était nettement filamenteux et beaucoup plus long que le bacille diphtéritique : légèrement effilé aux extrémités, il formait des chaînes intriquées, ne prenant pas le Gram et ne résistant pas à l'alcool absolu après action du violet de gentiane aniliné et phéniqué et de la solution de Lugol : le bacille de Kutscher restait coloré par ce dernier procédé. Le bacille isolé par Bongert, plus petit que le bacille diphtéritique, se présentait dans les lésions sous la forme d'un bâtonnet arrondi aux deux bouts.

Sur gélose, les colonies du bacille de Kutscher étaient profondément dentelées; il n'en était pas de même de celles du bacille de Bongert; dans nos cultures, les bords étaient onduleux. Ces bacilles se disposaient en longues chaînes immobiles dans le

bouillon qui, dans un cas, présentait un trouble granuleux, dans les autres, se revêtait d'un voile friable supportant des précipités phosphatiques. Le bacille de Bongert était anaérobie facultatif, les deux autres presque strictement aérobies.

La croissance sur pomme de terre tantôt nulle (Kutscher), ou presque (Sabrazès), était abondante avec le bacille de Bongert. Dans les vieilles cultures, tous ces bacilles se montraient granuleux, exceptionnellement avec corpuscules polaires colorables par le procédé de Ernst-Neisser (Bongert); ils présentaient parfois des renflements en boule ou en massue susceptibles de prendre le Gram (Bongert).

Aucun d'eux ne liquéfiait la gélatine, ne faisait fermenter la lactose, n'amenait la production d'indol.

Au point de vue de la virulence, le bacille de Kutscher, en émulsion concentrée, injecté sous la peau à la dose de 2 à 4 dixièmes de c. c., ne tuait qu'exceptionnellement la souris; très rarement, dans ces conditions, survenait une infection générale avec nodules purulents dans les poumons, les reins, la rate et le foie. L'ingestion des cultures restait sans effet. L'inhalation provoquait la mort de la souris grise domestique, avec production de foyers pulmonaires purulents, dans 20 0/0 des cas. La souris blanche était moins sensible. La souris des champs résistait toujours à ce mode d'inoculation. Dans le péritoine et dans le thorax, l'inoculation était toujours mortelle pour les diverses races de souris.

Le bacille de Bongert tuait toujours les souris par ingestion, produisant une ou plusieurs ulcérations le long du tube digestif d'où le bacille se propageait aux ganglions correspondants et aux viscères. Ce microbe s'éliminait du reste par les urines et par les matières fécales : des animaux sains placés dans les cages souillées par ces déjections contractaient la maladie et succombaient.

Les autres espèces animales inoculées par Kutscher — cobaye, lapin, chat, chien, poule — se montrèrent absolument réfractaires.

Bongert insiste sur la réceptivité très grande des souris blanches et grises; il n'a pu expérimenter sur la souris des champs. Par contre, l'inoculation échouait sur les rats, le cobaye, le lapin, le pigeon, le chien, le veau, la brebis, le cheval, le bœuf.

Les bacilles de Kutscher et de Bongert étaient donc exclusivement pathogènes pour la souris.

Notre bacille, virulent pour la souris et pour le surmulot, épargnait le cobaye et le lapin.

Ainsi les bacilles de Kutscher, de Bongert et le nôtre se comportaient de la même façon vis-à-vis des espèces animales autres que les muridés; par contre, ils tuaient la souris; le nôtre, provenant d'un surmulot, s'est montré virulent pour ce rongeur chez lequel il a provoqué une septico-pyohémie pseudotuberculeuse avec participation des plèvres, du foie, de la rate, des reins, des ganglions mésentériques, de l'épidyme, du tissu conjonctif sous-cutané. La parenté de ces micro-organismes cadre du reste très bien avec la similitude des lésions initiales d'où on les a isolés par la culture; ces lésions suppuratives intéressaient surtout l'appareil pleuro-pulmonaire.

DU ROLE DES IMMUNISINES (FIXATEURS)

DANS LA PHAGOCYTOSE

Par le Prof. J.-G. SAVTCHENKO

Lorsque Metchnikoff mit en avant la théorie de la phagocytose comme cause de l'immunité, les particularités et l'origine de ce phénomène n'étaient pas encore expliquées, bien que sa réalité n'eût soulevé aucun doute dans la pensée de ce savant ni dans celle de ses élèves. Alors, il n'y avait pas assez de données qui permissent de pénétrer plus au fond de la question.

La notion de la sensibilité du protoplasma vis-à-vis des substances chimiques, apportée dans la science par Pfeffer, a montré, entre autres choses, dans quelle direction il faut chercher les causes de la phagocytose : le phagocyte devient actif lorsqu'il est sensible à l'action des substances contenues dans dans l'organisme phagocyté.

Il ne faut pas oublier que si l'on a généralisé la participation de la chimiotaxie des leucocytes à tous les phénomènes de la phagocytose, c'était par analogie avec tous les cas bien étudiés de sensibilité des cellules, et en particulier des leucocytes à l'égard de certaines solutions. C'est pouquoi il ne serait pas impossible de supposer que les phagocytes sont parfois guidés par d'autres genres de sensibilité du protoplasma.

Il y a peu de temps, avant la découverte des sérums curatifs et spécifiques, le savant, quelle que fût sa manière d'envisager cette question, se comportait dans la solution de ce problème en observateur et non pas en expérimentateur, car il lui était impossible de modifier le phénomène par sa propre intervention.

La découverte des sérums antimicrobiens a donné une nouvelle impulsion à l'étude de cette question, en montrant la possibilité pour l'expérimentateur de conférer l'immunité à l'animal déjà malade.

L'école de Metchnikoff ayant démontré que le mécanisme de l'immunité se ramène au phénomène de la phagocytose, il était naturel de se demander pourquoi les phagocytes présentant la chimiotaxie négative à l'égard d'un microbe pathogène montrent

tout à coup la chimiotaxie positive et englobent ce microbe, aussitôt qu'on introduit dans l'organisme de cet animal, avec le sérum curatif, une certaine substance chimique.

Deux agents prennent part à ce phénomène : le phagocyte et le microbe pathogène.

Le phagocyte ne saisit pas le microbe qui s'est développé dans le corps d'un animal non immunisé. Si chez ce même animal, mais ayant reçu du sérum curatif, le même microbe est dévoré par les phagocytes, il s'est produit, évidemment, une modification quelconque, au moins dans l'un des deux facteurs prenant part à ce phénomène. Ce changement a lieu dans le leucocyte ou bien dans le microbe.

Les partisans de la théorie humorale de l'immunité tendaient, depuis le travail de Pfeffer sur les vibrions cholériques, à ramener l'effet des sérums curatifs à l'action directe de ces sérums sur les microbes.

L'ancienne théorie des humoralistes (Flügge, Behring, Buchner) sur l'action microbicide du sérum dans l'organisme a influencé l'interprétation de nouveaux faits apportés par Pfeffer et ses collaborateurs.

On a même essayé de démontrer l'action atténuante des sérums : les microbes, tout en continuant à vivre dans l'organisme immunisé, deviendraient moins virulents (Charrin et Roger).

D'un autre côté, Metchnikoff et ses élèves, par toute une série de recherches, ont montré que la mort extracellulaire des microbes, chez les animaux auxquels on a injecté des sérums spécifiques, a lieu seulement dans des cas exceptionnels, comme, par exemple, dans la cavité abdominale, et que le phagocyte reste toujours le facteur général de l'immunité.

Non seulement il a été impossible de démontrer l'action directe et destructive du sérum à l'égard des microbes, mais il a été constaté que les microbes ne perdent pas de leur virulence introduits dans l'organisme immunisé. Étant extraits de l'organisme de ce dernier pour être introduits chez un animal neuf, ils amenaient sa mort, comme c'est le cas du streptocoque et de la bactéridie du charbon. D'où il a fallu conclure que le microbe reste le même et que ce sont les propriétés des leucocytes qui changent : leur chimiotaxie, de négative, devient positive. Les

substances immunisantes, comme formulait Metchnikoff, *servaient de stimulines* pour les leucocytes.

Cependant, toutes les expériences sur lesquelles est basée la conclusion formulée plus haut montrent seulement que dans l'organisme animal la substance immunisante ne peut influer le microbe au point de le modifier, lui et ses générations, même après qu'on l'a soustrait à l'action des immunisines. C'est pourquoi ces expériences n'excluent nullement la possibilité d'expliquer ce phénomène (la phagocytose déterminant la guérison) par l'action directe du sérum sur les microbes.

En effet, la grande majorité des microbes pathogènes à l'état saprophyte, de même que quelques-uns dans leur forme pathogène (comme les bacilles de la tuberculose, de la lèpre, du rouget du porc) provoquent la chimiotaxie positive des leucocytes. Et on peut dire que tous les microbes, sans exception, même les formes très pathogènes, peuvent être phagocytés, lorsqu'ils sont tués par le chauffage. Il est évident que les corps microbiens eux-mêmes (et surtout, semble-t-il, leur substance nucléaire) provoquent la chimiotaxie positive des leucocytes; cette propriété fondamentale des leucocytes peut être considérée comme le résultat de l'accommodation du monde animal vis-à-vis des microbes.

Parmi les microbes, ceux-là seulement ne sont pas phagocytés qui ont acquis les propriétés spécifiques dans le corps de l'animal. Si on veut un exemple, n'importe quel microbe de septicémie (la bactéridie, le streptocoque, le staphylocoque, etc.) cultivé en dehors de l'organisme comme saprophyte et mis en contact avec des phagocytes, dans la cavité abdominale d'un animal, est d'abord englobé par ces derniers. Ce n'est qu'un peu plus tard qu'apparaissent des formes microbiennes dont le nombre devient prédominant et qui ne sont pas touchées par les phagocytes.

Il s'ensuit que le microbe, en outre des substances qu'il possède à l'état saprophyte, a acquis dans l'intérieur de l'organisme quelque chose de plus, qui provoque la chimiotaxie négative du leucocyte. Cette nouvelle propriété, basée sur la remarquable accommodation des microbes, les rend pathogènes, capables de causer l'infection générale de l'organisme [1].

1. Il s'agit ici seulement de formes infectieuses aiguës. Dans les infections

Il est tout à fait naturel d'expliquer la chimiotaxie négative des leucocytes par l'hypothèse que le microbe secrète une substance qui se condense surtout sur sa surface et le défend des leucocytes.

En faveur de cette hypothèse parlent l'action éminemment toxique de tels microbes sur les tissus environnants, ainsi que les modifications morphologiques des membranes, qu'on trouve d'une façon nette pour la bactéridie du charbon, pour les levures pathogènes et même pour le streptocoque. Il est bien possible que dans quelques cas il ne s'agisse que d'un état physique spécial de la surface du microbe, état qui le rend inaccessible au phagocyte.

Puisqu'on peut considérer, grâce aux expériences de Buchner et surtout à celles de Bordet, comme un fait bien établi que les « anticorps » (substance immunisante) des sérums ont une affinité spéciale pour les microbes correspondants et se fixent fortement sur leur surface, l'action des sérums peut être expliquée par la suppression de la propriété nouvelle du microbe que ce dernier a acquise dans l'organisme et grâce à laquelle il a été défendu contre les phagocytes, et que cette propriété soit due à une substance chimique spéciale ou bien à un état physique particulier de sa surface. L'action du sérum transforme alors le microbe pathogène en saprophyte facilement phagocyté par des leucocytes. On peut d'autant plus admettre ce mode d'action des immunisines (fixateurs) que d'après les recherches de Metalnikoff[1], les fixateurs peuvent être dissous dans le plasma et qu'ils passent du système circulatoire dans la lymphe qui lave les cellules et les rend accessibles à l'action des microbes quel que soit le siège de ces derniers.

Comme l'action de la substance immunisante (fixateur) ne se manifeste que par la neutralisation des propriétés spécifiques des microbes pathogènes, propriétés localisées à leur surface, il est bien entendu que les microbes soustraits de nouveau à l'action des substances immunisantes et mis dans les conditions antérieures, — si on les inocule à un autre organisme sensible — vont acquérir eux-mêmes ainsi que leurs générations

chroniques, comme la tuberculose, la lèpre, le rhinosclérome, l'infection est déterminée non pas par l'absence de la phagocytose, — cette dernière, au contraire, y est très intense, — mais bien par la résistance des microbes vis-à-vis des ferments digestifs des phagocytes.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900.

successives, la propriété de donner une infection mortelle, puisqu'ils ne seront pas phagocytés par des leucocytes.

C'est pourquoi il est évident que toutes les expériences qui démontrent que les microbes ne perdent pas pour toujours leur toxicité dans l'organisme immunisé, c'est-à-dire leur propriété de causer l'infection mortelle d'un autre animal, ne réfutent nullement l'hypothèse émise plus haut sur l'action des sérums.

A ce point de vue on peut expliquer facilement les expériences de Bordet sur l'infection streptococcique des animaux immunisés et traités avec le sérum. Cette manière de voir est d'ailleurs indiquée en partie par l'auteur, qui cependant ne l'érige pas en théorie [1].

On peut très facilement expliquer quelques faits touchant à l'immunité vis-à-vis du charbon [2] par l'action antitoxique du sérum à l'égard du poison spécial sécrété à la surface du microbe.

Il est vrai que, si d'une part il n'existe pas d'expériences réfutant notre hypothèse sur la possibilité de l'action directe des substances immunisantes sur les microbes, dans le sens indiqué plus haut, il serait excessivement difficile, d'autre part, de le démontrer par des expériences directes.

Rappelons-nous qu'à ce phénomène prennent part deux agents vivants et capables de modifier leurs fonctions : leucocyte et microbe, et que nous devons trouver lequel des deux devient modifiable sous l'influence du troisième agent constant, de la substance immunisante.

Le microbe est un objet très incommode pour la solution de ce problème. Comme être vivant, qui se multiplie très rapidement, il change si vivement ses propriétés qu'il n'est jamais possible à l'expérimentateur de s'assurer s'il a affaire dans son expérience au même microbe qui a été soumis à l'action des substances immunisantes, — que cela ait lieu dans l'organisme de l'animal immunisé ou bien en dehors de l'organisme, *in vitro*, — ou bien s'il a affaire à ses descendants qui ont déjà perdu toutes les propriétés qui leur ont été conférées par l'expérience. Le microbe est un élément changeant; c'est pourquoi il était impossible de conclure avec une entière certitude sur les modi-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897. *Archives russes de pathologie*, 1897.

fications des propriétés de l'autre agent de l'expérience, du leucocyte.

La doctrine des sérums immunisants, élargie par les expériences de Bordet, Metchnikoff et Ehrlich, avec la découverte des cytotoxines pour n'importe quelle cellule, permet actuellement de simplifier d'une façon notable les recherches sur le rôle des substances immunisantes spécifiques dans le phénomène de la phagocytose. Étant donné qu'il existe une analogie complète entre les lois qui régissent l'action des cytotoxines, et les lois de l'action des substances immunisantes sur les microbes, il est possible et tout à fait légitime d'opérer dans les expériences sur la phagocytose, non pas avec un élément changeant, — microbe, — mais avec une sorte de cellule animale, et il est plus facile d'opérer avec le globule rouge.

II

Comme l'a montré, le premier, Bordet [1], en introduisant les globules rouges de l'animal A dans l'organisme de l'animal B, on rend le sérum de ce dernier toxique pour les globules rouges de A. L'auteur a établi une analogie complète entre l'action *in vitro* de ce sérum sur les globules rouges et l'action des sérums immunisants spécifiques sur les microbes.

Dans le sérum spécifique se trouve une substance ou fixateur (d'après la terminologie de Metchnikoff) qui se fixe sur les globules rouges correspondants — ou bien sur les microbes — et par son action prépare ces derniers à leur dissolution par les alexines (cytases) qu'on trouve dans chaque sérum. Le fixateur ne se détruit pas à 55°-60°, la cytase cesse d'être active après le chauffage d'une demi-heure à 55°.

Ehrlich et Morgenroth [2] ont montré que le fixateur a une affinité spécifique pour les globules rouges correspondants, et qu'une fois fixé sur eux, il ne s'en détache pas dans les lavages ultérieurs, ainsi que dans la centrifugation dans l'eau physiologique. Si l'on soumet les globules rouges ainsi traités à l'action du sérum normal contenant des alexines (cytases), ils se dissolvent.

Il est facile de se convaincre que les globules rouges d'un

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.
2. *Berl. Klin. Woch.*, 1899., n° 1.

animal introduits dans la cavité péritonéale d'un autre animal de même espèce — même après provocation artificielle de la leucocytose dans cette cavité péritonéale — restent pendant plusieurs jours sans être englobés par des leucocytes, bien qu'ils soient en contact intime avec ces derniers.

Ce fait est si constant qu'il est impossible d'obtenir l'englobement des globules rouges, sans les avoir modifiés d'une façon spéciale. Les leucocytes sont aussi indifférents aux globules rouges lavés dans l'eau physiologique, centrifugés et conservés dans la glacière de 6 à 8 jours, qu'aux globules rouges qu'on vient d'extraire du vaisseau. Les leucocytes montrent la chimiotaxie négative à l'égard de leurs globules rouges. Il n'en pourrait pas être autrement, car, dans le cas contraire, ils dévoreraient leurs voisins rouges, dans l'intérieur même des vaisseaux sanguins[1]. Nous possédons donc dans les globules rouges un remarquable objet d'une forte chimiotaxie négative.

Si les sérums hémolytiques présentent une analogie complète avec les sérums bactériolytiques, il faut s'attendre à ce qu'en présence du sérum spécifique pour les globules rouges donnés, la chimiotaxie négative naturelle des leucocytes devienne positive et qu'ils commencent à englober les globules rouges de cette même espèce et même leurs propres globules rouges.

Prenons comme objets de notre expérience les phagocytes du cobaye, ses globules rouges et le sérum de lapin immunisé contre les globules rouges de cobaye, et chauffons préalablement le sérum à 55° pour détruire ses alexines, en laissant intacte le fixateur spécifique[2].

Après avoir provoqué, 24 heures avant l'expérience, la leu-

1. Il est incontestable que dans quelques cas il existe une perversion de cet état normal et que les phagocytes dévorent leurs propres globules rouges. J'ai pu constater il y a quelques années, d'une façon très nette, la phagocytose des globules rouges par les macrophages (dans les vaisseaux du foie) dans un cas de leucémie aigus, à issue fatale, et compliquée de purpura hémorragique. On observe une phagocytose très marquée des globules rouges dans le corps thyroïde, dans le goître exophtalmique, et cela aussi bien au niveau des endothéliums vasculaires, que dans les espaces périvasculaires. Il est probable que dans la maladie d'Addisson le processus a lieu dans les espaces périvasculaires.

2. Nos expériences ont porté principalement sur des cobayes et des lapins. En immunisant des lapins contre les globules rouges de cobaye, ainsi que les cobayes vis-à-vis des globules rouges de lapin, nous avions une réserve de sérum hémolytique de ces deux espèces de globules rouges.

La plupart des expériences ont été pratiquées avec le sérum de lapin hémoytique pour les globules rouges de cobaye. C'est pourquoi nous ne parlons dans notre exposé ultérieur que des expériences faites sur les cobayes.

cocytose dans la cavité péritonéale des cobayes A et B par l'injection de 3 c. c. de bouillon, on y introduit des globules rouges de cobaye débarrassés de leur sérum par le lavage. L'étude de l'exsudat péritonéal cueilli 4 heures après le commencement de l'expérience montre l'absence de toute phagocytose. Introduisons maintenant dans la cavité péritonéale du cobaye A de 1/10 à 1/4 de c. c. (selon son pouvoir toxique) de notre sérum. Nous gardons le cobaye B comme témoin. Une heure après nous pouvons déjà observer la phagocytose des globules rouges chez le cobaye A. Au bout de 4 heures ce phénomène est très marqué : les globules rouges sont englobés non seulement par des mononucléaires qui en sont farcis, mais aussi par des polynucléaires, lesquels à l'état normal sont très peu actifs même à l'égard des globules rouges d'espèce différente. Ce phénomène se poursuit les jours suivants jusqu'à résorption complète des globules rouges dans la cavité péritonéale.

Chez le témoin B, les globules rouges restent intacts même les jours suivants; ils disparaissent de la cavité abdominale, évidemment, en passant dans les vaisseaux lymphatiques.

Si on introduit dans la cavité péritonéale du cobaye neuf des globules rouges en même temps que du fixateur (avec le sérum privé de ses alexines), alors les globules rouges, suivant la quantité introduite, seront complètement dissous, ou bien une partie seulement de ces globules rouges sera dissoute et le reste deviendra la proie des phagocytes.

Ces expériences sont absolument analogues aux expériences classiques avec les microbes (par exemple avec le vibrion cholérique), elles montrent que l'intervention du fixateur spécifique détermine le phénomène de phagocytose des éléments comme les globules rouges qui normalement ne sont pas englobés par les leucocytes de leur espèce.

Mais dans cette expérience ainsi posée, nous ne savons pas si la philocytase a agi sur les globules rouges ou bien sur les leucocytes.

En modifiant cette expérience, tâchons d'élucider deux questions posées par nous plus haut :

1) Si le fixateur agit directement sur les globules rouges et les modifie au point de les rendre accessibles aux phagocytes normaux.

2) Ou bien si l'action de la philocytase s'exerce sur les leuco-

cytes dont le protoplasma manifeste, sous l'influence de cette action, la chimiotaxie positive vis-à-vis des globules rouges normaux.

III

La phagocytose aurait-elle lieu si on ajoutait des leucocytes aux globules rouges préalablement traités par le fixateur?

Après avoir défibriné le sang de cobaye, lavons les globules rouges, en les centrifugeant dans l'eau physiologique, pour les débarrasser de leur sérum et des alexines qui se trouvent dans ce dernier. On dilue le dépôt ainsi obtenu dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour faire quatre fois le volume de sang préalablement pris, et on ajoute en excès[1] du sérum hémolytique, chauffé à 55° pendant une demi-heure, c'est-à-dire privé de ses alexines.

On laisse le tout déposer à la température de la chambre pendant une demi-heure. Après avoir centrifugé et bien agité le dépôt agglutiné dans une quantité aussi grande que possible d'eau physiologique, on centrifuge de nouveau, et on répète la même opération 2-3 fois. Il est impossible de retrouver le sérum hémolytique dans l'eau physiologique après ces lavages. Après avoir agité avec soin le dernier dépôt dilué dans une quantité d'eau physiologique, égale aux 4 volumes du sang primitif, nous obtenons des globules rouges ayant subi l'action du fixateur qui ne se trouve plus ici à l'état libre.

Injectons, comme dans l'expérience précédente, 1/2 c. c. de ce mélange aux cobayes : au cobaye A (dans la cavité péritonéale duquel on a injecté, 24 heures avant l'expérience, du bouillon) et au cobaye témoin B. Chez le cobaye A, on constatera rapidement une phagocytose énergique des globules rouges ; chez le cobaye B, la dissolution extracellulaire de la plupart d'entre eux et une phagocytose successive des globules non dissous.

On réussit la même expérience lorsque, au lieu de procéder dans l'organisme animal, on opère *in vitro* et dans l'étuve. Après avoir dilué, avec de l'eau physiologique, l'exsudat contenu dans

1. Nous ajoutions 1 c. c. de sérum à toute la quantité du sang (400 grammes) ; 1/4 de c. c. de ce sérum, introduit dans la cavité péritonéale du cobaye, tuait cet animal au bout de 2 jours, en donnant lieu à des phénomènes d'hémolyse.

la cavité péritonéale du cobaye qu'on vient de sacrifier, et chez lequel on avait provoqué la leucocytose, nous y ajoutons des globules rouges traités de la façon indiquée plus haut, l'effet est le même : c'est-à-dire phagocytose des globules rouges par des leucocytes. On peut suivre d'une façon nette le processus même de phagocytose sous le microscope, dans une goutte suspendue placée dans une chambre chaude à 37°.

Dans les expériences parallèles faites aussi bien *in vitro* que *in vivo*, avec des globules rouges normaux, on constate l'absence de phagocytose.

Dans l'expérience précédente, nous traitions les globules rouges avec l'excès de sérum, et nous avons remarqué le phénomène d'agglutination bien net. On peut admettre la modification de la structure physique des globules rouges due aux dilutions et aux centrifugations répétées. Mais pour obtenir le même effet, il n'est pas nécessaire d'avoir une grande quantité de sérum.

Après avoir traité les globules rouges comme dans l'expérience précédente, et après les avoir dilués dans la même proportion d'eau physiologique, nous y ajoutons la quantité de sérum hémolytique chauffé à 55° suffisante pour faire une solution de 1/200 [1], cette dilution ne montrait aucune trace d'agglutination après 6 heures de séjour dans l'étuve.

Après la centrifugation et le triple lavage du dépôt (pour ce faire on le dilue avec 20 fois son volume d'eau), nous obtenons des globules rouges qui ne s'agglutinent nullement. Ces derniers ont cependant attiré le fixateur, puisqu'il suffisait de les additionner de sérum normal pour amener la dissolution de leur hémoglobine.

Les expériences pratiquées avec cette quantité de globules rouges, aussi bien *in vitro* que *in vivo* (dans la cavité péritonéale du cobaye injecté préalablement avec du bouillon), ont donné les mêmes résultats ; la phagocytose des globules rouges apparaissait d'une façon aussi nette et aussi rapide.

Dans les expériences mentionnées plus haut, les leucocytes ne subissaient aucune action directe du fixateur, et si la

1. Cette quantité de sérum, dans sa dilution au 1/200, exerçait une action hémolytique marquée, au cas où il n'était pas privé, par le chauffage, de ses alexines.

phagocytose était plus intense que normalement, ce fait était évidemment déterminé par des modifications survenues dans les globules rouges ayant subi l'action du fixateur.

Étant donné que la même loi régit l'action du fixateur sur les cellules animales et sur les microbes, on peut admettre que la réaction phagocytaire, qui détermine l'immunité vis-à-vis du microbe, peut être due à l'action directe du fixateur (substance immunisante) sur le microbe.

IV

Ce mode d'action du fixateur est-il toujours obligatoire? Cette action ne pourrait-elle pas provoquer la phagocytose en agissant directement sur les leucocytes.

Dans notre étude de l'immunité vis-à-vis de la fièvre récurrente, nous avons exécuté une série d'expériences qui montrent que les leucocytes peuvent englober des substances immunisantes spécifiques et, grâce à cela, modifier leur sensibilité à l'égard des spirochètes [1].

On peut obtenir des résultats plus démonstratifs en expérimentant avec des globules rouges.

Après avoir provoqué la leucocytose dans la cavité péritonéale des cobayes A et B, introduisons, le lendemain, dans la cavité péritonéale du cobaye A la quantité de sérum hémolytique. un peu inférieure à la dose mortelle pour un animal d'un poids donné [2].

Douze heures après, nous injectons dans la cavité péritonéale du cobaye A (qui a reçu du sérum) et dans celle du cobaye témoin B des globules rouges de cobaye débarrassés de sérum. Déjà, au bout de quelques minutes, on constate une phagocytose très marquée chez le cobaye A. Une heure après, tous les mononucléaires sont gorgés de globules rouges; on trouve aussi des polynucléaires ayant saisi des globules rouges. Chez le cobaye B, comme toujours, la phagocytose manque complètement, ou

1. *Archives russes de pathologie*, 1900.

2. Nous déterminions chaque fois pour ces expériences la dose mortelle minima pour l'injection de sérum dans la cavité abdominale. Cette dose est 3 ou 4 fois plus petite que dans le cas d'injection sous-cutanée. Selon le degré d'immunisation du lapin, nous utilisons le sérum mortel en injection intra-abdominale pour une dose de 1/4 à 1/10 de c. c.

bien on trouve, comme une rare exception, quelques globules rouges dans l'intérieur des mononucléaires.

Mais il se pourrait que dans cette expérience, les globules rouges aient subi l'action du fixateur qui se trouve dans le plasma. Cette hypothèse vient d'autant plus à l'esprit que les agglutinines s'y trouvent incontestablement; les globules rouges ont tendance à se mettre en amas.

Les globules rouges modifiés par la philocytase doivent être très sensibles à l'action des alexines du sérum.

C'est pourquoi, dans une autre expérience, on a introduit, chez l'animal préparé de la même façon, des globules rouges non lavés, mais suspendus dans le sérum en excès de l'animal dont on a pris des globules rouges. Pour cela, après avoir centrifugé le sang, on séparait les globules rouges du sérum, et on les additionnait d'un sérum pur jusqu'à coloration rouge clair.

Après avoir injecté 1/2 c. c. d'un tel mélange dans la cavité péritonéale d'un cobaye traité préalablement par le fixateur, nous n'avons pas constaté de dissolution des globules rouges dans les préparations de l'exsudat péritonéal, mais seulement la phagocytose, comme dans la première expérience. Et cependant nous y avons introduit avec du sérum des alexines en excès.

Mais peut-être les alexines sont-elles résorbées par les cellules avant que la petite quantité de fixateur libre, suivant notre hypothèse, ait pu agir sur les globules rouges.

Pour supprimer cette possibilité, nous avons procédé de la façon suivante dans une autre série d'expériences.

On introduisait, dans la cavité péritonéale du cobaye, 3 c. c. de bouillon, 24 heures avant l'expérience. On provoquait ainsi la leucocytose dans la cavité péritonéale, et on rendait, croyons-nous, les leucocytes plus sensibles pour les globules rouges. Le lendemain, on introduisait dans la cavité péritonéale 1/4 de c. c. de globules rouges lavés et additionnés d'eau physiologique jusqu'au volume primitif du sang. Une heure après, on observait déjà la phagocytose des globules rouges.

Si la phagocytose dépendait de l'adhérence du fixateur aux globules rouges, ces derniers doivent être dissous par des alexines.

Introduisons, maintenant que la réaction phagocytaire a commencé, dans la cavité péritonéale du même cobaye, 1 c. c.

de sérum pris antérieurement chez un autre cobaye et chauffé à 37° [1]. L'examen répété de l'exsudat péritonéal dans l'intervalle des 2 heures qui ont suivi, n'a pas montré de dissolution des globules rouges,

On pouvait constater aussi *in vitro* cette dissolution des globules rouges, si dans cette expérience, au moment où commençait la phagocytose, on mélangeait dans une chambre humide une goutte d'exsudat péritonéal avec du sérum normal, c'est-à-dire avec des alexines en liberté. *Aussi les globules rouges peuvent-ils être phagocytés sans avoir de fixateur sur leur surface.*

Toutes ces expériences montrent qu'en présence des leucocytes dans la cavité péritonéale, il est impossible d'y déceler l'existence d'un fixateur à l'état libre, même si l'on y en avait introduit quelques heures avant l'expérience. Le fixateur est, évidemment, absorbé par des leucocytes, ce qui détermine le changement de leur sensibilité.

Mais on peut faire encore une objection : il n'est peut-être pas nécessaire, pour provoquer le phénomène de phagocytose, d'avoir une quantité de fixateur assez considérable pour dissoudre les globules rouges en présence des alexines. Il est possible qu'il existe dans le plasma un minimum de fixateur, insuffisant pour être décelé par la réaction de dissolution, mais tout à fait suffisant pour provoquer la phagocytose après s'être fixé sur ces derniers.

Pour supprimer tout fixateur qui pourrait se trouver à l'état libre en dehors des leucocytes, on n'avait qu'à faire l'expérience *in vitro* après avoir lavé dans l'eau physiologique des leucocytes qui ont absorbé le fixateur, d'après notre hypothèse.

Nous injections dans la cavité péritonéale du cobaye le mélange de 3 c. c. de bouillon et de sérum [2]. Le lendemain on y introduisait 2 c. c. d'eau physiologique chauffée à 37° pour diluer l'épais exsudat leucocytaire. Immédiatement après, on saignait le cobaye à blanc, on défibrinait le sang et on lavait les globules rouges pour les débarrasser du sérum. On poursuivait l'expérience en les divisant en 3 parties, comme il suit :

1. Il n'est pas inutile de prendre cette précaution, quand on fait des injections dans la cavité abdominale, car une oscillation brusque de température peut provoquer une désagrégation partielle des phagocytes et le passage dans le plasma des substances contenues dans leur intérieur.

2. Dans ces expériences, aussi bien que dans les autres, on injectait au cobaye une dose inférieure à la dose mortelle minima.

I. La cavité péritonéale immédiatement ouverte, on aspirait dans une pipette, contenant de l'eau physiologique chauffée à 37°, de l'exsudat péritonéal. On séparait par la centrifugation les leucocytes suspendus dans l'eau physiologique. On ajoutait de nouveau à ces leucocytes 10 c. c. d'eau physiologique et, après avoir agité avec soin le mélange, on centrifugeait encore une fois. Cette manipulation, assez grossière il est vrai, fait périr beaucoup de leucocytes, ce sont surtout les mononucléaires qui succombent. Mais les leucocytes et surtout les polynucléaires, qui se sont déposés au fond du tube à essai, se sont bien conservés. Après avoir décanté la couche de liquide qui se trouve au-dessus d'eux (ce qui n'est pas difficile à faire, car les leucocytes adhèrent en masse compacte au fond du tube), on agitait les leucocytes qui restaient avec 1 c. c. d'eau physiologique. On versait quelques gouttes de leucocytes en suspension dans l'eau physiologique à 0,7 0/0 et on y ajoutait 1 goutte de globules rouges de cobaye neuf, débarrassés du sérum et lavés dans l'eau physiologique. On plaçait le mélange à l'étuve.

II. On ajoutait aux leucocytes lavés, restés après cette expérience, 1/2 c. c. de sang de lapin neuf pour obtenir le caillot, la désagrégation des leucocytes du cobaye et le passage dans le sérum des substances contenues dans les leucocytes. On laissait le mélange pendant 2 jours à la glacière, après quoi on obtenait, après centrifugation, le sérum tout à fait transparent et non teinté par l'hémoglobine. On ajoutait à ce sérum, ainsi qu'à la même quantité de sérum normal de cobaye, la même qnantité de globules rouges de cobaye, pour pouvoir juger par les degrés de dissolution des globules rouges si le fixateur a été absorbé par les leucocytes de notre cobaye.

III. On introduisait des globules rouges lavés de notre cobaye dans la cavité péritonéale du cobaye neuf (chez qui on avait provoqué préalablement la leucocytose par l'injection du bouillon); ainsi on pouvait, selon qu'il avait phagocytose ou non des globules rouges, juger de la présence ou de l'absence du fixateur sur les globules rouges de notre cobaye qui avait reçu du sérum hémolytique dans sa cavité péritonéale.

Les résultats de cette expérience ont été les suivants :

1. *Les leucocytes débarrassés du plasma mais immunisés par le fixateur englobaient* in vitro *des globules rouges normaux de cobaye;*

2. *Le sérum obtenu par le mélange de sang de lapin et de leucocytes de notre cobaye, dissolvait les globules rouges faiblement, mais d'une façon beaucoup plus marquée que le sérum témoin de lapin ;*

3. *Les leucocytes normaux de cobaye ne phagocytaient qu'un nombre insignifiant de globules rouges de notre cobaye. Quant aux globules rouges restés non englobés, les leucocytes montraient le lendemain à leur égard la même indifférence qu'ils manifesteraient si on les mettait en présence du sang de cobaye neuf.*

En résumant les expériences indiquées dans les chapitres III et IV, nous arrivons à cette conclusion que le fixateur peut déterminer la phagocytose des éléments qui ne sont pas phagocytés à l'état normal, et cela de deux façons :

1. *Il peut se fixer sur son objet spécifique (dans notre cas, sur le globule rouge) et le modifier à tel point que le phagocyte change à son égard sa chimiotaxie négative en chimiotaxie positive ;*

2. *Le fixateur peut être absorbé par le protoplasma des phagocytes. Ces derniers, chargés du fixateur, acquièrent la chimiotaxie positive vis-à-vis de la substance sensible au fixateur, dans notre cas le globule rouge, bien que celui-ci ne soit pas modifié par le fixateur : la base de la fonction physiologique de la phagocytose réside dans une affinité chimique.*

V

Après avoir étudié l'action du fixateur d'une part sur les phagocytes de l'animal en expérience, d'autre part sur les globules rouges qu'on introduisait dans l'animal, voyons maintenant ce que deviennent les globules rouges de l'animal quand on lui injecte des hémotoxines.

Les expériences de Bordet [1] ont déjà montré que les animaux périssent plus ou moins vite, suivant la dose injectée. Dans ce cas survient l'hémolyse des globules rouges dans les vaisseaux sanguins et l'hémoglobine apparaît dans l'urine.

Cantacuzène [2] a montré que chez des animaux, injectés avec des doses non mortelles d'hémotoxine, on observe, à la suite de ces injections, une diminution plus ou moins marquée des globules rouges.

1. *L. c.*
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, n° 3.

On observe chez l'homme la même diminution des globules rouges, immédiatement après l'injection de doses relativement petites de sérum hémolytique, comme cela résulte du travail de MM. Metchnikoff et Bezredka [1].

Cet effet est tout à fait compréhensible, si on injecte une grande quantité de sérum hémolytique non chauffé, c'est-à-dire contenant des alexines : la dissolution des globules rouges survient alors comme *in vitro*, et si l'animal vit quelque temps, l'hémoglobine passe dans l'urine.

Mais si une diminution notable des globules rouges suit l'injection de doses faibles et même, comme il est facile de s'en convaincre, l'injection de sérum chauffé, privé de sa cytase, on a peine à croire que cette baisse du taux des globules rouges soit due simplement à leur dissolution. Personne n'a indiqué l'existence de l'hémoglobinurie dans ce cas. D'après nos expériences, cette dernière n'existe pas.

On peut s'attendre, d'après l'analyse des expériences indiquées dans les chapitres II, III et IV, à ce que le fixateur introduit dans l'organisme de l'animal, pour les globules rouges duquel il est spécifique, modifie ces globules de telle façon qu'ils se comportent vis-à-vis des leucocytes comme des corps étrangers de l'organisme. C'est aussi ce que l'on observe, par exemple, pour les bactéries, lorsque dans un organisme malade intervient l'immunité à l'égard de ce microbe, que cette immunité soit naturelle ou qu'elle soit acquise à la suite de notre intervention.

L'étude détaillée des phénomènes qu'on observe dans l'organisme intoxiqué par l'hémotoxine est poursuivie actuellement dans notre laboratoire.

Je ne mentionnerai dans ce chapitre que les faits qui se rapportent directement au sujet de notre mémoire et offrent, par leur analogie avec des maladies infectieuses, une signification générale pour la doctrine de l'immunité.

Déjà, les modifications microscopiques qu'on trouve dans les organes à la suite des injections de différentes doses d'hémotoxine montrent que le mécanisme de leur action n'est probablement pas toujours le même.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, n° 3, p. 408.

I. *Grandes doses.* — Si l'animal périt 1 ou 2 jours [1] après l'injection sous-cutanée du sérum hémolytique non chauffé, on fait les constatations suivantes à son autopsie :

Le sang est non seulement pauvre en globules rouges, mais il se trouve en petite quantité dans les vaisseaux, même d'après l'examen à l'œil nu. On observe une anémie très marquée.

Le foie présente une couleur brune. La rate a la même couleur, parfois même elle est d'un brun noir ; rarement elle est hypertrophiée, on constate parfois la diminution de son volume, surtout chez des lapins traités par le sérum hémolytique.

Les reins, surtout les pyramides, sont infiltrés de pigment sanguin. L'urine est colorée d'une façon intense par le pigment sanguin, mais ne contient pas d'éléments figurés du sang.

Les globules rouges qui se trouvent dans les vaisseaux eux-mêmes sont modifiés dans leurs dimensions et leurs formes (microcytes, macrocytes et poikylocytes); beaucoup d'entre eux sont dans le stade de dissolution d'hémoglobine.

Il est évident qu'il s'agit ici d'une hémolyse active telle qu'on la constate *in vitro*.

II. Si l'animal meurt plus lentement, avec des doses moindres de sérum ou à la suite d'inoculation de sérum chauffé, ne renfermant que le fixateur, au 5e, 7e ou 8e jour après l'injection, on trouve encore assez souvent une quantité considérable de sang dans les vaisseaux, bien que beaucoup de globules rouges montrent des modifications caractéristiques. La rate présente un volume tantôt normal, tantôt elle est hypertrophiée, quoique d'un brun foncé, comme dans le premier cas. Le foie est aussi parfois hypertrophié. Les pyramides du rein sont infiltrées de pigment; l'urine renferme de l'hémoglobine. Les muqueuses, le tissu sous-cutané et les séreuses présentent la teinte ictérique. Le muscle cardiaque est friable, en partie en dégénérescence granuleuse, en partie en dégénérescence graisseuse.

Si on sacrifie quelques-uns de ces animaux injectés avec des doses moyennes, le 2e ou le 3e jour après l'injection, le tableau est tout autre. Pas d'hémoglobine dans l'urine. La rate est toujours très hypertrophiée; elle n'est pas noire, quoique hyper-

1. Pour obtenir cet effet, nous avions besoin, dans nos expériences, suivant le pouvoir toxique du sérum, de 1 à 1 1/2 c. c. pour un cobaye de 400 grammes.

hémiée. Le foie est hypertrophié et hyperhémié. Les reins ne présentent pas de modifications. On constate parfois, 7 à 12 heures après l'injection, une hypertrophie marquée de la rate; cette hypertrophie ne peut pas être mise entièrement sur le compte de l'hyperhémie, si l'on en juge d'après le réplétion de ses vaisseaux sanguins.

III. On observe également l'hypertrophie aiguë de la rate et l'hypertrophie partielle du foie dans l'intoxication des animaux par des doses non mortelles. Après avoir injecté sous la peau ou dans la cavité péritonéale d'une série de cobayes, des doses non mortelles, nous sacrifions successivement, 12 heures, 24 heures et 48 heures après l'injection, une partie de ces animaux. Nous avons toujours observé chez ces cobayes (dont les témoins restaient vivants), comme dans la deuxième série de nos expériences, une hypertrophie de la rate, sans avoir jamais trouvé la moindre hémoglobinurie. *La rate réagit dans l'empoisonnement par l'hémotoxine de la même façon que dans la maladie infectieuse.* Cela est compréhensible, puisque les leucocytes, grâce à l'action du fixateur spécifique, se sont comportés envers les globules rouges comme ils se comporteraient envers des éléments étrangers, qui auraient exercé sur eux une irritation spécifique.

Déjà, en expérimentant dans la cavité péritonéale du cobaye, nous avons pu nous convaincre que lorsqu'on y introduit du fixateur, les leucocytes dévorent non seulement les globules rouges d'un autre cobaye, mais même les leurs propres. On peut facilement obtenir ce résultat si, après avoir préparé le cobaye, on introduit dans sa cavité péritonéale quelques gouttes de sang pris dans son oreille; ou bien si l'on fait, à l'aide d'une canule, un petit traumatisme dans la cavité péritonéale.

Les mêmes phénomènes se passent dans les vaisseaux, surtout dans la rate et dans le foie des animaux, auxquels on a injecté des doses moyennes ou faibles d'hémotoxine dans la période d'hypertrophie de la rate, quand l'hémolyse n'est pas encore très marquée.

A l'état normal, la rate est le siège de la résorption des globules rouges morts; on peut toujours y trouver des polynucléaires ayant dévoré des globules rouges. Mais en examinant attentivement des frottis de pulpe splénique dans l'eau physiolo-

gique, on peut facilement constater que la majorité des leucocytes contiennent non seulement des globules rouges à peine modifiés, mais le plus souvent le produit de la désagrégation de ceux-ci sous forme d'amas de pigment. Ce processus se poursuit lentement; les phagocytes ne saisissent qu'un nombre insignifiant de globules rouges morts.

Sur des préparations semblables, mais provenant de la rate (au moment de son hypertrophie) des cobayes traités avec de l'hémotoxine, on trouve au contraire une quantité considérable de phagocytes, littéralement bourrés de globules rouges encore bien conservés et qui viennent, évidemment, d'être englobés.

En examinant la pulpe du foie dans la période préhémolytique de l'intoxication, on peut trouver le tableau de la phagocytose des globules rouges dans les cellules étoilées. Sur les coupes, on trouve souvent dans les veines hépatiques des mononucléaires (probablement des cellules endothéliales détachées) ayant englobé des globules rouges.

On trouve plus rarement la phagocytose dans la moelle osseuse. On obtient cette phagocytose des globules rouges propres de l'animal, aussi bien chez les animaux auxquels on a injecté des doses mortelles minima (et dans ces conditions l'animal a été sacrifié et étudié 24 heures après l'empoisonnement) que chez des animaux qui ont reçu des doses non mortelles et dont les témoins survivaient.

Il est évident que la diminution marquée du nombre des globules rouges, qui suit, chez l'homme ou chez l'animal, l'injection des doses non mortelles de sérum hémotoxique est due surtout à la réaction phagocytaire, et non pas à la dissolution directe des globules rouges dans le plasma.

Nous ne trouvons pas le même tableau de phagocytose à l'examen de la rate des animaux morts dans la période d'hémolyse ; on est plutôt porté à penser à la leucolyse d'après la désagrégation des leucocytes. C'est à cette période que correspond la diminution du volume de la rate et sa friabilité. *La désagrégation des leucocytes amène évidemment l'apparition des alexines dans le sang, et c'est à cela qu'est dû le processus de dissolution des globules rouges.*

Les expériences exécutées après ablation de la rate parlent

en faveur de l'intervention de cet organe dans le processus d'hémolyse.

Après avoir splénectomisé 2 cobayes, nous leur injectons, 3 jours après l'opération, ainsi qu'à un témoin, des doses mortelles de sérum hémolytique. Le témoin est mort d'hémolyse le 3e jour. L'un des deux cobayes splénectomisés est mort le 12e jour après l'opération, avec des phénomènes d'ictère, d'amaigrissement général et d'hémolyse ; le second a survécu.

Dans une autre série d'expériences, nous avons pris 4 cobayes splénectomisés, de 350 à 400 grammes chacun, et 3 témoins, dont 2 pesaient 370 grammes chacun et le 3e 500 grammes.

On a injecté sous la peau de tous ces cobayes (l'expérience a été faite le 4e jour après la splénectomie) une même dose mortelle de sérum hémolytique. Tous les animaux splénectomisés ont survécu ; deux témoins qui pesaient le même poids que ces derniers sont morts le 3e jour; le 3e témoin, de 500 grammes, a survécu.

Ainsi, la première réaction qui apparaît dans le système circulatoire, après l'intoxication par les hémolysines, est la phagocytose des globules rouges.

Si l'on ne peut pas toujours dire, dans ces expériences, si la phagocytose est due à une action directe sur les globules rouges ou bien sur les leucocytes, il est encore plus difficile de résoudre ce problème en analysant ce processus complexe dans l'organisme entier.

Cependant nous pouvons puiser quelques indications dans les expériences antérieures.

Dans le chapitre IV, nous avons relaté une expérience dans laquelle on introduisait dans la cavité péritonéale du cobaye, préparée par l'injection préalable de bouillon, du sang provenant d'un autre cobaye injecté avec une petite dose d'hémotoxine. Grâce à cela, les leucocytes de ce cobaye acquéraient la propriété de phagocyter des globules rouges normaux. Cependant un petit nombre de globules rouges de ce cobaye, comme on le voit dans l'expérience citée plus haut, se sont chargés du fixateur et ont acquis la propriété de devenir la proie des phagocytes du cobaye normal.

Nous avons également expérimenté avec le sang des cobayes qui ont reçu le fixateur et qui ont été sacrifiés pour l'étude

de leurs organes dans la période préhémolytique (chap. V).

Les expériences sur la phagocytose, ou bien sur l'action directe des alexines sur ce sang, ont montré qu'une partie insignifiante des globules rouges seulement prend le fixateur dans cette période.

Cependant, chez les témoins, qu'on a laissé survivre à la période de désagrégation des leucocytes, survient une hémolyse énergique.

Ces considérations rendent très probable l'hypothèse que non seulement dans la cavité péritonéale, c'est-à-dire dans des conditions exceptionnelles, mais aussi dans tout l'organisme, le fixateur hémotoxique se fixe aussi bien sur les globules rouges que sur les leucocytes, et que les deux modes d'action mènent à la manifestation de la fonction phagocytaire des leucocytes vis-à-vis de l'objet spécifique du fixateur, dans notre cas vis-à-vis du globule rouge.

Des recherches ultérieures devront montrer si ce double mode d'action des immunisines a toujours lieu dans les infections causées par tel ou tel microbe. Nous pouvons nous attendre d'avance à des réponses différentes en travaillant avec des microbes différents, car chaque mode d'action dépend, évidemment, de l'affinité plus ou moins grande d'un fixateur donné tantôt vis-à-vis de son microbe spécifique, tantôt vis-à-vis du protoplasma des phagocytes.

Quoi qu'il en soit, cette question sera résolue dans chaque cas particulier. Mais ce qui est déjà fait dans cette direction permet de considérer comme la plus probable l'hypothèse que les substances immunisantes fixatrices sont des stimulines pour les phagocytes, parce d'une part elles manifestent une affinité (se fixent) pour leur objet spécifique, par exemple pour le microbe; de l'autre part, pour le protoplasma des phagocytes, et en particulier pour la cytase renfermée dans ces derniers.

A ce point de vue, les substances immunisantes servent, dans le phénomène de phagocytose, d'intermédiaires entre l'objet phagocité et le phagocyte. C'est pourquoi elles méritent entièrement la dénomination de « corps intermédiaires » (*Zwischen-Korper*), que leur a donnée Ehrlich guidé par les considérations sur leur action humorale dans l'immunité.

SUR LES CYTASES

PAR LE Dr L. TARASSÉVITCH, DE KIEW (RUSSIE).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Dans son travail sur la résorption des cellules[1], M. Metchnikoff, après avoir étudié le sort des globules rouges d'oie injectés dans le péritoine ou sous la peau de cobayes, a établi que, chez les animaux neufs, ce sont presque exclusivement les leucocytes à noyau unique, les macrophages, qui saisissent ces globules et les digèrent dans leur intérieur d'une façon tout à fait pareille à celle que l'on observe dans les cellules de l'intestin des planaires. Les polynucléaires ne le font qu'à titre exceptionnel. La partie liquide de l'exsudat ne joue aucun rôle; on ne remarque jamais de dissolution extracellulaire. Les mêmes phénomènes s'observent si, au lieu de globules rouges d'une espèce étrangère, on introduit des spermatozoïdes ou des leucocytes. Les mêmes macrophages assurent ici encore la phagocytose.

En prélevant, à des intervalles différents, de petites quantités d'exsudat et en les étudiant tant à l'état frais que sur des préparations colorées, on trouve des globules rouges libres et intacts ou des globules phagocytés en état de digestion plus ou moins prononcée.

En même temps, une partie des leucocytes, bourrés d'hématies, viennent se fixer sur l'épiploon et de là un certain nombre passent dans les ganglions mésentériques, la rate, le foie, et plus tard pénètrent dans la circulation générale. On peut les décéler dans le sang de la veine cave et dans le cœur droit. Quelques jours après, le sérum de l'animal, ainsi que ses exsudats, acquièrent des propriétés nouvelles, on y voit apparaître une agglutinine et une hémolysine, ou, pour être plus exact, un fixateur spécifique.

1. *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, p. 737-769.

Donc, premier point important, l'apparition de ces substances spécifiques est subordonnée à l'acte de la phagocytose et de la digestion intracellulaire, ce qui fait déjà penser que ces substances doivent être produites par les leucocytes et notamment par les macrophages.

Pour pousser l'analyse plus loin, M. Metchnikoff a étudié les propriétés des extraits de différents organes de cobayes neufs et de cobayes traités par des injections de sang d'oie. Il a vu que, seuls, les organes macrophagiques : l'épiploon, les ganglions mésentériques et la rate possèdent des propriétés dissolvantes. Tous les autres organes, y compris la moelle osseuse, n'ont aucun pouvoir hémolytique.

Pour déterminer la nature de la substance dissolvante de ces extraits, il les a soumis à la température de 56° pendant 45 minutes ou 1 heure, après quoi ces extraits sont devenus inactifs.

Il est donc légitime d'admettre qu'il s'agit ici d'une substance pareille à celle qui confère les propriétés hémolytiques aux sérums ; qu'il s'agit ici d'une cytase.

Cette cytase, étant donné son origine, peut être appelée macrocytase ; en effet, les organes que nous venons d'énumérer sont les foyers principaux des macrophages. C'est à l'aide d'une cytase analogue ou identique que les macrophages du sang ou de la lymphe digèrent les cellules animales et c'est elle qui, passée dans le sérum lors de la formation du caillot, confère à ce sérum son pouvoir globulicide.

Nous savons depuis longtemps, grâce surtout aux travaux de M. Metchnikoff et de ses élèves, que dans la lutte contre les microbes, c'est aux leucocytes polynucléaires, aux microphages, qu'appartient le rôle de beaucoup le plus important. Toute une série de travaux de M. Buchner et de ses élèves, de M. Denys et de ses élèves, et de beaucoup d'autres savants, travaux exécutés dans le but d'appuyer la théorie humorale de l'immunité, ont amené les auteurs à reconnaître que les leucocytes doivent être considérés comme les producteurs des substances bactéricides, des alexines ou cytases. Mais, amenés à cette conclusion, ils maintinrent néanmoins la doctrine humorale (quoique entamée il est vrai), en admettant la sécrétion vitale des cytases par les leucocytes et la présence de ces dernières dans le sang circulant.

Il n'entre pas dans notre sujet de discuter ces théories. Les travaux publiés sur cette question, non seulement par les partisans, mais encore par les adversaires de la théorie des phagocytes, et, en dernier temps, les travaux de M. Gengou[1] sur l'origine de l'alexine des sérums normaux, faits dans le laboratoire de M. Metchnikoff, ont bien démontré l'exactitude de la doctrine phagocytaire; ils ont établi, d'une part, que les polynucléaires doivent être considérés comme les producteurs de la cytase contenue dans les sérums; de l'autre, que cette cytase ne se trouve pas dans les plasmas et ne passe dans les humeurs qu'après la destruction des leucocytes.

Certes, on est encore en droit de désirer et de chercher la dernière preuve, c'est-à-dire l'isolement de ces substances à l'état pur; mais les preuves d'ordre biologique sont déjà suffisantes pour entraîner la conviction.

Si l'on considère le rôle des macrophages dans la destruction des cellules animales et celui des microphages dans la lutte contre les microbes, et si l'on se souvient des faits établis par M. Metchnikoff relativement à la résorption des cellules et aux transformations subies par les éléments englobés dans ces deux catégories de phagocytes, on arrive à la supposition que ces différences doivent être dues à des ferments digestifs, à des cytases différentes.

La question du nombre des cytases contenues dans un sérum est loin d'être résolue d'une façon uniforme par les savants qui s'en sont occupés.

Ainsi, d'un côté, MM. Buchner et Bordet sont partisans de l'unité de la cytase: toutes les actions globulicides et bactéricides d'un sérum donné seraient produites par une seule et même cytase (alexine, d'après leur terminologie).

La première considération, en faveur de cette théorie, est l'analogie des actions globulicides et bactéricides; la seconde, beaucoup plus importante, consiste en ceci : si l'on ajoute à un sérum quelconque des éléments sensibilisés, bactéries ou globules, ces éléments fixent toute l'alexine (ou toutes les alexines) contenue dans ce sérum (Bordet[2]). De sorte que le sérum, ainsi traité, devient incapable par suite d'exercer aucune action hémolytique ou bactéricide.

1. *Ann. Inst. Pasteur*, 1901, p. 68-84; *ibid.*, p. 232-248.
2. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, p. 257-296.

Ce fait, bien établi relativement à un nombre considérable de sérums, de globules et de bactéries, a certainement une grande valeur, mais il ne peut être considéré comme une preuve absolue de l'unité de la cytase parce que l'élément sensibilisé peut bien entraîner non seulement la cytase qui sert à produire une action sur cet élément, mais encore bien d'autres ferments et enzymes. Des faits analogues ont été déjà observés dans l'histoire des diastases; ainsi, la fibrine, est capable de fixer non seulement la trypsine et la pepsine, mais encore d'autres ferments.

M. Wilde[1] a réussi dans quelques cas à fixer toute la cytase d'un sérum, même par des éléments non sensibilisés, mais tout simplement sensibles à l'action de cette cytase. Ainsi, par exemple, le vibrion cholérique et le coccobacille typhique, mis en contact avec le sérum de chien pendant un temps suffisamment long et en quantité suffisante, lui enlèvent toute sa cytase. Le sérum devient ensuite inactif vis-à-vis des globules qu'il dissolvait auparavant. Dans les mêmes conditions, le bacille charbonneux, non sensible à l'action du sérum du chien, laisse cette cytase intacte.

Telles sont les preuves apportées par les unicistes.

D'un autre côté, MM. Ehrlich et Morgenroth[2], Neisser[3], Wechsberg[4] et certains autres auteurs, défendent la théorie de la pluralité des cytases. Il serait trop long d'exposer toutes les considérations d'ordre théorique qui amènent MM. Ehrlich et Morgenroth à conclure que chaque sérum normal contient toute une série de compléments (cytases) différents; nous nous contenterons de mentionner les faits principaux qui servent de base à cette manière de voir. Ainsi, ces savants ont trouvé dans le sang d'un bouc traité avec du sang de mouton, non seulement une cytase ordinaire qui est détruite par la température de 56°, mais encore une autre cytase thermostabile; il en était de même dans quelques sérums de chèvres et de veaux normaux.

Du sérum de cheval qui dissout les globules de cobaye ainsi que ceux de lapin, ils parvinrent à séparer deux complé-

1. *Berl. Klin. Woch.*, 1901, p. 878-881.
2. *Berl. Kl. Woch*, 1899, p. 481-486; *ibid.*, 1900, p. 691-687; *ibid.*, 1901, p. 598-604.
3. *Deut. Med. Woch.*, 1900, p. 790-792.
4. *Wien. Klin. Woch.*, 1901, p. 1194.

ments : un, actif vis-à-vis des globules de lapin, est retenu par le filtre (Puxallfilter), tandis que l'autre, actif vis-à-vis des globules de cobaye, passe à travers. Par les injections de sérum normal, ils ont obtenu ensuite un antisérum capable de neutraliser non seulement l'action du sérum ayant servi à l'immunisation, mais de plusieurs autres sérums. D'où ils tirent la conclusion que le sérum ayant servi pour l'immunisation, devait contenir plusieurs compléments, parce qu'il provoqua la formation de plusieurs anticompléments.

Neisser a montré que le sérum de lapin additionné d'une quantité suffisante de bacilles charbonneux tués, perd ses propriétés bactéricides tout en conservant son pouvoir hémolytique, d'où il conclut à la présence d'au moins deux compléments, dont l'un serait bactéricide et l'autre hémolytique. Enfin, tout dernièrement encore, Wechsberg communiqua l'expérience suivante : le sérum de chèvre, actif contre les globules de cobayes et contre le vibrion de Nordhafen, après avoir dissous une quantité suffisante de sang de cobaye, perd son pouvoir hémolytique, c'est-à-dire devient incapable de dissoudre une nouvelle portion de sang, tout en restant actif vis-à-vis le vibrion Nordhafen. De ce fait l'auteur tire une conclusion analogue à celle de Neisser. On peut accepter cette interprétation ; mais on peut aussi objecter que, après avoir hémolysé une certaine quantité de sang, le sérum devient incapable d'en dissoudre encore, non pas par suite de l'épuisement de sa cytase, mais par suite de l'accumulation des produits du processus hémolytique, qui empêchent la cytase encore restante d'exercer son action. Du reste, M. Bordet (*l. c.*) a démontré que les globules normaux sont incapables de fixer toute la cytase, puisque le sérum qui ne dissout plus les globules normaux, dissout encore bien les globules sensibilisés.

Comme l'on peut juger d'après cet exposé, la question n'est pas encore résolue. Pour la trancher, il faudrait pouvoir isoler la ou les cytases des sérums à l'état pur. Mais comme il est difficile d'apporter des preuves décisives en travaillant avec le sérum, il est naturel d'essayer de tourner la difficulté et de s'adresser pour cela aux sources des cytases, aux leucocytes et aux organes producteurs de ces leucocytes.

Dans le travail déjà cité de M. Gengou, il a été établi que les

leucocytes polynucléaires contiennent, sous un même volume, une quantité plus considérable de cytase bactéricide que le sérum correspondant, tandis que les mononucléaires n'en contiennent pas du tout ou très peu. On doit donc considérer ces polynucléaires ou microphages comme producteurs de la microcytase contenue dans le sérum ; ce qui cadre bien avec les faits relatifs à la phagocytose des microbes par cette espèce de leucocytes. Mais si l'on n'admet dans le sérum qu'une cytase à laquelle on attribue à la fois le pouvoir bactéricide et globulicide, on se heurte à une contradiction : les microphages producteurs de la cytase ne prennent pour ainsi dire aucune part dans l'englobement et la digestion des hématies, quoique contenant le ferment nécessaire, tandis que les macrophages, privés de cytase, les phagocytent et les digèrent d'une façon énergique. Au contraire, il suffit d'admettre que les deux variétés de leucocytes qui présentent de fonctions différentes, possèdent aussi deux cytases différentes : microcytase et macrocytase, pour que les faits que nous venons d'exposer, s'expliquent d'une façon simple et claire.

Cette théorie de deux cytases a été prévue et indiquée par M. Metchnikoff qui a bien voulu nous charger d'étudier la question. Nous le prions d'accepter ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour sa bienveillance constante et pour les conseils qu'il nous donnait au cours de notre travail.

Action hémolytique des extraits d'organes.

Pour étudier l'action dissolvante des extraits d'organes [1], nous nous sommes adressé principalement à des cobayes, à des lapins et à des chiens. Comme réactifs, nous employons le plus souvent les globules rouges d'oiseaux (oie, poule, pigeon) qui sont plus commodes à observer grâce à leur volume, à leur forme et, surtout, à la présence de noyaux, et aussi le sang des mammifères (cobaye, lapin, chien, etc.). Après

1. Nous préparions nos extraits de la façon suivante : l'organe à examiner était coupé avec des ciseaux et trituré dans un mortier sur une toile métallique ou avec du sable très fin, en y ajoutant peu à peu de l'eau physiologique (à 0,85 0/0) en quantité 4-5 fois plus grande que le poids de l'organe. L'extrait-émulsion ainsi obtenu, après un séjour de 2-4 heures à l'étuve à 37°, était placé à la glacière pendant 16-24 heures et ensuite servait pour les expériences.

la centrifugation du sang défibriné et 2-3 lavages à l'eau physiologique pour faire disparaître toute trace de sérum, on préparait une émulsion des hématies dans un volume d'eau physiologique égal à celui du sérum décanté. Avec ces émulsions des hématies et des extraits d'organes, nous faisions des mélanges dans des tubes à essai ou dans des verres de montre, ainsi que des préparations en goutte suspendue. Ces mélanges ont été toujours laissés au laboratoire à la température ordinaire (15°-20°); quelquefois seulement on les portait à l'étuve, lorsqu'on cherchait à avoir une action plus rapide.

Chez les cobayes, la grande majorité des organes se montraient, dans tous les cas examinés, inactifs, même après un contact de plusieurs jours avec les globules énumérés plus haut. Ainsi, nous avons trouvé la moelle osseuse dépourvue de tout pouvoir hémolytique, même si l'on prenait 20 parties de l'extrait pour 1 partie de l'émulsion de globules. Nous avons examiné, au point de vue de son action hémolytique, 10 extraits différents. Il en fut de même pour le foie qui a été examiné 11 fois, le rein 6 fois, les ganglions surrénaux 4 fois; les ovaires 2 fois, les testicules 2 fois, le cerveau 2 fois, et la moelle épinière 1 fois.

Tout autres ont été les résultats obtenus avec les extraits des organes macrophagiques: épiploon, ganglions mésentériques et rate. Ici les extraits sont actifs dans la grande majorité des cas, sinon toujours. Ainsi l'épiploon se montra hémolytique dans 25 cas sur 28, les ganglions mesentériques 24 fois sur 26 et, enfin, la rate 23 fois sur 29 [1].

Outre ces organes macrophagiques, il faut encore mentionner les glandes digestives, et surtout le pancréas dont les extraits possédaient un pouvoir dissolvant vis-à-vis des hématies dans tous les cas observés (8 fois), et les glandes salivaires qui provoquaient souvent (3 fois sur 4) une hémolyse légère.

La dissolution par ces extraits se fait d'une façon identique à celle produite par les sérums hémolytiques. Si l'on prend les globules d'oiseaux, on voit d'abord les noyaux deve-

1. Tout dernièrement M. Schibayama, du laboratoire de M. Kitasato, a publié dans le *Centralbl. f. Bact.* (1901, Bd. xxx, p. 760) un travail dans lequel il dit avoir constaté aussi que, chez les cobayes, la rate et les gang. lymphatiques, sont hémolytiques pour les globules de chien. Tous les autres organes, y compris la moelle osseuse, ne l'étaient pas. L'auteur n'a pas examiné les extraits de l'épiploon.

nir apparents; ensuite. les hématies prennent une forme ronde, commencent à pâlir; enfin, il ne reste de visible que le noyau arrondi et, en diaphragmant fortement, on voit la membrane des globules qui se transforment en vésicules nucléées incolores. Les noyaux ne se dissolvent pas dans les extraits. Si l'on conserve les préparations en gouttes suspendues pendant plusieurs jours (jusqu'à 7, 8 et même plus), on voit encore les noyaux, quoique gonflés et irréguliers. Seulement toutes ces altérations, au lieu de s'accomplir en quelques heures et même en quelques minutes, comme cela s'observe avec les sérums fortement hémolytiques, ne commencent d'ordinaire qu'après plusieurs heures de contact et ne s'accomplissent que lentement. Il faut souvent 24 heures, quelquefois même plus longtemps, pour que l'hémolyse se fasse. Il va sans dire qu'étant donné cette lenteur d'action, nous avions toujours soin de préparer des mélanges témoins : hématies-extraits des organes inactifs, hématies-sérums, etc. La dissolution par les extraits d'organes le plus souvent n'est précédée ni accompagnée d'agglutination, ce qui est encore une preuve de l'indépendance de ces deux phénomènes. Mais avant d'entrer dans les détails et pour ne pas tomber dans des redites, nous exposerons brièvement les résultats obtenus chez d'autres animaux, notamment chez les lapins et les chiens.

Chez les lapins, l'épiploon se montre actif 3 fois sur 8, la rate 7 fois sur 11, les ganglions mésentériques 8 fois sur 12. La moelle osseuse, le foie, le thymus, se sont montrés toujours inactifs. Les glandes salivaires sont faiblement dissolvantes. En général, le pouvoir hémolytique des extraits des organes de lapin est inférieur à celui des organes de cobaye. Chez les chiens, l'épiploon hémolysa 2 fois sur 4 [1], les ganglions mésentériques 5 fois sur 7, et enfin la rate 5 fois sur 7. D'autres organes — foie, rein, testicule, poumon, glande thyroïde, moelle osseuse, ne produisent pas d'hémolyse. Le pancréas est très hémolytique.

En somme, on peut affirmer que de tous les organes de l'économie, ce sont seulement les organes macrophagiques et les

1. Il faut remarquer que la préparation de l'extrait de l'épiploon chez les chiens est très difficile, par suite de sa grande surcharge graisseuse. On ne réussit que difficilement et encore avec les épiploons maigres. L'épiploon de lapin est aussi peu commode à manier ; on est empêché par la disposition anatomique du pancréas et par la présence très fréquente de parasites (coccidies).

glandes digestives qui possèdent un pouvoir hémolytique plus ou moins marqué. Pour déterminer la force hémolytique respective de chacun de ces extraits, nous avons procédé ainsi : nous employions d'ordinaire des mélanges de 5 parties d'extrait pour une partie d'émulsion de globules. Si l'hémolyse se faisait vite et d'une façon énergique, nous préparions des mélanges en proportion de 3 : 1 ; 2 : 1 (et même 1 : 1) ; si, au contraire, l'hémolyse ne ne se faisait pas ou était très faible, nous ajoutions de nouvelles quantités d'extrait jusqu'à la proportion de 10 : 1. Les extraits qui en cette proportion ne donnaient pas d'hémolyse au bout de 24 à 36 heures, étaient considérés comme inactifs. Il serait trop long et inutile de résumer ici tous les tableaux d'observations étant donné leur ressemblance. Il suffit d'en présenter trois, un pour chaque espèce animale employée.

I

A midi.		A 4 h.	A 7 h.	Le lendemain à midi.	Le surlend. matin.
1) Extrait de l'épipl. de cobaye..... / Emuls. d'hématies d'oie.........	5 parties. / 1 partie.	Dissolution complète.			
2) Extrait des gangl. mésent .... / Hém. d'oie	5 parties. / 1 partie.	Dis. à peine commencée.	Dissolution faible.	Dissolution forte.	Dissolution complète.
3) Extrait de la rate. / Hém. d'oie......	5 parties. / 1 partie.	Dissolution faible.	Dis. presq. complète.	Dissolution complète.	
4) Ext. de la moelle osseuse........ / Hém. d'oie......	5 parties. / 1 partie.	0	0	0	0
5) Ext. du pancréas. / Hém. d'oie......	5 parties. / 1 partie.	Dissolution complète. *			
6) Extrait du foie .. / Hém. d'oie......	5 parties. / 1 partie.	0	0	0	0
7) Sérum du même cobaye........ / Hém. d'oie......	5 parties. / 1 partie.	0	0	0	0

* La dissolution par les extraits de pancréas s'accompagne d'un changement de couleur du sang. Le liquide perd vite sa coloration rose et devient brunâtre.

II

A 5 h. du soir.		A 7 h.	Le lendemain à 11 h.	A 7 h.
1) Sérum de lapin.... / Hématies d'oie.....	6 parties. / 1 partie.	Légère agglutination.	*Idem.*	Dissolution très faible.
2) Extrait de l'épiploon........... / Hém. d'oie........	6 parties. / 1 partie.	0	Dissolution faible.	Dissol. plus prononcée, mais incomplète.
3) Extrait de la rate.. / Hém. d'oie........	6 parties. / 1 partie.	0	Dissolution complète.	

4) Extrait des gangl. mésent......... Hém. d'oie.........	6 parties. 1 partie.	0	Dissolution complète.	
5) Extrait de la moelle osseuse......... Hém. d'oie........	6 parties. 1 partie.	0	0	0

III

		Après 4 h.	Après 24 h.
1) Sérum de chien.......... Hématies de cobaye......	10 parties. 1 partie.	Dissolution complète.	
2) Extrait de l'épiploon...... Hém. de cobaye..........	10 parties. 1 partie.	0	Dissolution incomplète.
3) Extrait des gangl. mésent. Hém. de cobaye..........	10 parties. 1 partie.	Dissolution commençante.	Dissolution complète.
4) Extrait de la rate......... Hém. de cobaye..........	10 parties. 1 partie.	Dissolution commençante.	Dissolution complète.
5) Extrait de foie........... Hém. de cobaye..........	10 parties. 1 partie.	0	0
6) Extrait de la glande thyroïde.................. Hém. de cobaye..........	10 parties. 1 partie.	0	0

Comme on peut voir d'après ces expériences (et les autres sont concordantes à ce point de vue), le pouvoir hémolytique des organes macrophagiques paraît ne pas être en rapport direct avec celui des sérums correspondants : par exemple, le sérum de cobaye est inactif, ou dans quelques cas très faiblement actif, vis-à-vis des hématies employées ; il en est de même pour celui de lapin. Le sérum de chien possède, au contraire, une puissance hémolytique considérable.

Or, les organes macrophagiques se montrent doués de propriétés globulicides chez ces trois espèces. Faut-il en conclure qu'il s'agit ici de substances autres que les cytases ?

Déjà les faits observés par M. Metchnikoff relativement au sort des hématies injectées, le rôle joué dans ce processus par les macrophages et la constitution anatomique des organes étudiés, parlent contre une pareille supposition et font, au contraire, penser que les substances hémolysantes contenues dans les extraits, doivent être analogues à celles des sérums.

Les organes macrophagiques devraient leurs propriétés à la présence d'un ferment protéolytique endo-globulaire, mis en liberté par la destruction des cellules, d'une macrocytase.

Pour s'assurer de la justesse de cette hypothèse, il fallait appliquer à nos extraits les réactions qui permettent de conclure à la présence de cytases et avant tout d'étudier l'influence de la chaleur.

Si l'on chauffe les extraits à la température de 55,5-56° pendant une demi-heure ou une heure, on voit que le pouvoir hémolytique, tantôt disparaît, tantôt diminue et, dans quelques cas, rares, il est vrai, reste même presque sans changement, c'est-à-dire que l'extrait chauffé agit, après le chauffage, dans les mêmes proportions et en même temps qu'avant. On peut en juger d'après le tableau suivant :

Les extraits de l'épiploon ont été examinés à ce point de vue 10 fois, sur ces 10 expériences nous avons observé :

L'abolition complète des propriétés hémolytiques	5 fois.
Leur affaiblissement plus ou moins considérable	5 —
Leur conservation	3 —

Pour les extraits des ganglions mésentériques examinés 10 fois :

Abolition complète	4 fois.
Affaiblissement	5 —
Conservation	1 —

Pour les extraits de la rate examinés 12 fois :

Abolition	8 fois.
Affaiblissement	3 —
Conservation	1 —

Ainsi, l'influence de la température n'apparaît pas, au premier abord, d'une façon aussi nette et évidente que pour les sérums actifs dont les cytases sont toujours détruites par le chauffage pendant une demi-heure à la température de 56°, sauf dans dans quelques cas spéciaux indiqués par MM. Ehrlich et Morgenroth; mais la différence n'est qu'apparente. En effet, les cytases se trouvent dans les extraits et dans les sérums dans des conditions différentes de milieu, et celles-ci influencent la résistance des cytases à la chaleur. M. Buchner[1] a démontré, par exemple, que l'addition de sulfates alcalins et de chlorure de sodium augmente la résistance des alexines des sérums vis-à-vis de la chaleur.

En plus, il faut prendre en considération ce fait que, dans les extraits, la macrocytase est loin d'être mise entièrement en liberté. Au contraire, on peut affirmer qu'elle est retenue en grande partie par des débris cellulaires contenus dans ces extraits-émulsions, et qu'elle n'abandonne ces débris que lentement et d'une façon incomplète. En effet, l'émulsion entière se montre toujours plus active que la partie liquide obtenue par la décantation au repos ou par la centrifugation. Si on filtre

1. *Archiv für Hygiène*, 1892, v. 10, p. 112-178.

l'extrait sur du papier buvard, le liquide clair qui passe est en grande partie privé des propriétés propres à l'émulsion entière.

Ce liquide, dans lequel toute la cytase présente est en dissolution, se comporte vis-à-vis de la température comme les sérums. On peut donc comprendre facilement la thermostabilité relative des extraits, par analogie avec ce que nous savons sur la façon dont la chaleur influence toutes sortes de diastases et de toxines en solution et à l'état sec. Toutes ces substances, à l'état dissous, sont beaucoup plus sensibles au chauffage que quand elles sont desséchées ou se trouvent fixées sur des éléments solides.

Du reste, cette thermostabilité n'est pas très considérable, puisque, quand nous portions nos extraits à des températures un peu plus élevées, 58.5, 60, 62°, pendant 1 à 2 heures, le pouvoir hémolytique disparaissait complètement. Ce fait est à rapprocher des constatations relatives aux extraits de différents endo-enzymes ou ferments endo-cellulaires, obtenus jusqu'à présent, comme l'endo-trypsine des levures de MM. Martin et Hahn[1], l'amibodiastase de Mouton[2] et l'actinodiastase de Mesnil[3] qui sont tous inactivés à la même température de 60°.

Donc, par rapport à l'influence de la chaleur, la parenté avec les cytases des sérums est bien claire. Il est évident que l'on ne peut pas attribuer ce pouvoir hémolytique qui est aboli à de si basses températures, à des phénomènes osmotiques où à la présence de quelques substances chimiques.

L'expérience suivante prouve que l'on peut réussir à activer l'action de ces extraits par l'addition des fixateurs spécifiques.

I

1) Emulsion de globules de lapin	1 partie.	Dissolution complète en 12 heures.
Sérum fixateur	2 parties.	
Extrait de l'épiploon de cobaye	4 —	
2) Emulsion de globules de lapin........	1 partie.	Agglutination ; pas de dissolution.
Sérum fixateur........................	2 parties.	
Extrait de l'épipl. chauffé............	4 —	
3) Emulsion de globules de lapin........	1 partie.	Dissolution faible en 12 heures.
Extrait de l'épiploon non chauffé.....	6 parties.	
4) Emulsion de globules de lapin........	1 partie.	Aggl. légère + traces de dissolution.
Sérum de cobaye neuf chauffé........	2 parties.	
Extrait de l'épipl. de cobaye	4 —	

1. *Zeitschrift für Biologie.* Bd. XL, p. 117-172.
2. *Société de Biologie*, 20 juillet 1901.
3. *Ann. Inst. Pasteur*, 1901, p. 352-397.

II

1) Extrait de l'épiploon de cobaye........	6 parties.	Dissolution incomplète après 6 heures.
Emulsion des hématies d'oie..........	1 partie.	
2) Extrait de l'épiploon..................	4 parties.	Dissolution complète après 3 h. 1/2.
Sérum fixateur.........................	2 —	
Emuls. des hém. d'oie..............	1 partie.	

Certes, l'action du fixateur n'est pas aussi rapide qu'avec des sérums frais.

Cela tient-il au passage très lent de la macrocytase dans le liquide, ou à ce qu'elle se trouve dans l'intérieur des cellules, dans un état un peu différent de celui où elle est dans le sérum? Il est difficile de le dire quant à présent. Le fait n'en constitue pas moins un argument en faveur de l'opinion que nous soutenons.

En étudiant les organes des animaux immunisés, on trouve que les propriétés hémolytiques des organes macrophagiques restent les mêmes et que d'autres organes n'acquièrent pas ces propriétés par l'immunisation. Le fait que les organes macrophagiques n'ont pas leur pouvoir globulicide augmenté par l'immunisation, peut être expliqué de la façon suivante : c'est dans ces organes que se trouvent en majeure partie les globules injectés ou plutôt leurs débris. Or, on sait que les éléments sensibles prennent les fixateurs et les cytases. Donc, rien d'étonnant que la force globulicide des organes macrophagiques ne paraisse pas être accrue. On voit seulement que presque tous les organes deviennent agglutinants; les agglutinines diffusent donc facilement dans l'organisme. La présence de petites quantités de fixateur peut aussi être démontrée en ajoutant les extraits chauffés à du sérum neuf. Même dans les organes macrophagiques des animaux normaux, on peut démontrer la présence de la substance fixatrice — naturellement, non spécifique — comme on peut en juger par l'expérience suivante :

Extrait chauffé de la rate de chien, 5 parties. + Sérum lapin, 5 parties. + Emulsion des hématies d'oie, 1 partie....................	= Dissolution complète en 24 h.
Même extrait, 10 parties. + Emulsion des hématies, 1 partie..........................	= O
Sérum lapin, 10 parties. + Emulsion des hématies, 1 partie..............................	= Agglutination.
Extrait chauffé de gang. mésentériques, 5 parties. + Sérum lapin, 5 parties. + Emulsion des hématies, 1 partie........................	= Dissolution complète.

Nous avons recherché si les agglutinines et les fixateurs

passent dans l'urine et si ces substances se retrouvent chez le fœtus. Pour cela nous avons examiné des extraits faits avec des fœtus entiers (chez les femelles pleines de cobayes, ayant reçu pendant la grossesse 2-3 injections de sang d'oie), avec des placentas et avec du liquide amniotique; dans tous ces cas nous n'avons vu aucune action dissolvante, ni fixatrice.

*
* *

Il était tout indiqué, après que nous avons constaté la présence d'une macrocytase dans les organes énumérés, de voir s'ils renferment aussi une microcytase, c'est-à-dire s'ils sont capables d'une action bactéricide. Le nombre des expériences que nous avons faites sur ce sujet, est trop petit pour permettre d'exprimer une opinion ferme; il faudra les compléter. Mais les quelques expériences que nous avons faites, peuvent néanmoins servir à indiquer que l'action bactéricide est loin d'être prononcée, au moins quant aux ganglions mésentériques.

Les ganglions mésentériques d'un chien, en proportion de 10 : 1, dissolvent le sang d'oie en 7 heures 1/2. Le sérum, étendu de 3 fois son volume d'eau physiologique (l'organe étant broyé avec 3 fois son poids d'eau physiologique, il faut prendre aussi le sérum de même dilution), dissout le même sang deux fois plus vite. A des quantités égales (1 c. m.) de chacun de ces deux liquides, on ajoute un peu d'émulsion de culture cholérique. On ensemence les tubes aussitôt, dans les deux cas, un nombre considérable de colonies : après 9 heures, 200 colonies pour le sérum et ∞ pour les ganglions; après 22 heures, 23 colonies pour le sérum et ∞ pour les ganglions mésentériques. Nous avons obtenu des résultats analogues avec les ganglions mésentériques de lapins et de cobayes; dans un de ces cas, la moelle osseuse se montra bactéricide. On voit donc que les pouvoirs hémolytique et bactéricide des organes sont loin de marcher de pair.

Les faits que nous venons d'exposer démontrent que les organes macrophagiques doivent jouer un rôle dans l'élaboration des hémolysines naturelles et artificielles. M. London[1], se basant sur les connaissances relatives à l'importance de la rate dans la lutte contre différents microbes, a eu l'idée d'étudier

1. *Archives des Sciences biologiques* (*russes*), 1901, v. VIII, n° 4, p. 333.

l'influence de l'ablation de la rate sur l'élaboration des hémolysines. Après avoir dératé plusieurs cobayes, il commença à immuniser quatre d'entre eux presque aussitôt après l'opération (le premier une heure après, le deuxième le lendemain, le troisième deux jours après). Aucun de ces cobayes ne lui donna de sérum hémolytique. De ces faits M. London conclut que la rate joue un rôle de premier ordre dans l'élaboration de l'hémolysine.

Ce que nous savons sur le pouvoir hémolytique des organes, et sur le rôle des macrophages du sang et de la lymphe, dans le processus d'englobement et de digestion des globules d'espèce étrangère ne nous permet pas d'attribuer à la rate un rôle exclusif. C'est pourquoi nous avons repris les expériences de M. London, en nous mettant dans des conditions un peu différentes. Nous avons dératé un certain nombre de cobayes ; nous avons enlevé l'épiploon à d'autres ; chez d'autres encore, nous avons extirpé les ganglions mésentériques; et enfin, à la dernière série, nous avons enlevé tous ces organes à la fois. (Il est à remarquer qu'à cette dernière opération, un très petit nombre d'animaux ont survécu.) Après avoir gardé nos animaux jusqu'au rétablissement complet et retour au poids primitif (de 2 à 4 semaines), nous avons commencé à les immuniser, en même temps que des témoins, par des injections intrapéritonéales et sous-cutanées des hématies d'oie, faites à 8 jours d'intervalle. Après 3 injections, nous avons examiné les sérums de tous ces animaux et nous avons constaté que les sérums des animaux ainsi opérés, étaient tout aussi actifs que ceux des témoins. Il n'est donc pas possible, d'attribuer la propriété de produire les hémofixateurs et les macrocytases à un seul organe. Chez les animaux opérés, on trouve une hypertrophie des plus prononcées de tous les ganglions lymphatiques et une leucocytose très considérable ; il ne manque donc pas d'éléments capables de remplacer, au point de vue de la formation des hémolysines, les organes enlevés.

Ainsi, les organes macrophagiques ont un pouvoir hémolytique bien marqué, tandis que la moelle osseuse, foyer principal des microphages, en est dépourvue. Or, les rapports paraissent être justement contraires, relativement à l'action bactéricide de ces mêmes organes.

***

Action hémolytique des exsudats : rapports qui existent entre les macrocytases et les microcytases; influence du fixateur sur la phagocytose.

Si l'on injecte dans le péritoine de cobaye les hématies d'une espèce étrangère, lavées et émulsionnées dans la solution physiologique, afin d'éviter l'action du sérum sur les phagocytes et sur les hématies elles-mêmes, et si l'on prélève les exsudats pour les étudier ensuite[1], on peut observer les phénomènes suivants : pendant quelque temps, les globules rouges restent libres et intacts ; puis après un temps variable, entre 1 et 3 heures, commence l'afflux des leucocytes parmi lesquels les microphages jouent un rôle pour ainsi dire passif; si l'on arrive à voir un microphage englober une hématie, ce n'est qu'à titre d'exception, alors que les macrophages commencent leurs fonctions dès les premières heures et les poursuivent jusqu'à l'absorption complète de tous les globules. Pour que la phagocytose soit totale, il faut un temps variable selon la quantité du sang injecté : 24 heures et même moins peuvent suffire, quand on injecte des quantités faibles (1/2 à 1 c. c.) d'émulsions des hématies à 5-10 0/0. Il faut, au contraire, 3 à 4 jours et même plus quand on emploie des émulsions non diluées et en quantités relativement grandes, 3-5-7 c. c. Dans ces cas, en faisant des examens successifs, on voit que le nombre des hématies libres diminue de plus en plus, mais que les hématies restent toujours intactes en conservant leur forme et leur hémoglobine. Lorsque, après la disparition de l'exsudat, on tue l'animal et qu'on fait des frottis avec l'épiploon qui est en ce moment couleur de rouille, et chargé d'un grand nombre d'éléments figurés de l'ancien exsudat, on voit, à côté des macrophages bourrés d'hématies englobées à de différents stades de digestion, encore un certain nombre d'hématies libres, ayant leur aspect normal et ne présentant qu'un seul changement, la colorabilité plus faible des noyaux par les couleurs basiques. Ce fait est peut-être dû au passage de quelques substances du noyau dans le protoplasma, c'est ce qui serait à rapprocher des formes en tonneau décrites par M. Metchnikoff (*l. c.*).

1. Nous avons fait pour cela des préparations en gouttes suspendues et des préparations colorées.

Dans ce cas on ne trouve donc aucune trace d'action humorale. L'affirmation contraire de von Dungern qui, en injectant dans le péritoine des cobayes du sang de pigeon, observa surtout de la dissolution extracellulaire et qui, partant, ne fait jouer aux macrophages qu'un rôle de second ordre, ne peut être expliquée que par le fait qu'il a injecté du sang défibriné et non des hématies émulsionnées dans de l'eau physiologique. Le sérum ainsi injecté, d'une part, provoque une phagolyse considérable, et de l'autre, peut être nuisible à des hématies.

L'emploi du rouge neutre qui colore d'une façon intense les noyaux des globules rouges phagocytés est très commode; on peut suivre les processus *in vitro*, pas à pas, mais il est à remarquer que l'emploi de cette couleur n'est pas une chose indifférente. Si on fait des préparations en chambre humide, avec les gouttes d'exsudat, prélevées à l'aide de pipettes, on observe, au bout de 24 heures, une hémolyse complète dans les préparations additionnées du rouge neutre, tandis que le phénomène n'a pas lieu dans les préparations ordinaires.

En étudiant attentivement les changements survenant *in vitro* et *in vivo*, on peut remarquer que *in vitro* une certaine partie des hématies subit l'hémolyse extracellulaire, ce qui n'a jamais lieu *in vivo*. Il est à noter que, seules, les hématies se trouvant au voisinage de macrophages avariés, subissent cette dissolution, de sorte qu'on a l'impression que le fait doit être attribué à quelques substances échappées du phagocyte après sa destruction. Cette dissolution extracellulaire ne s'observe que quand l'exsudat prélevé est déjà assez riche en macrophages, c'est-à-dire quand il est prélevé 10 heures et plus tard après l'injection du sang. Pourquoi cette dissolution ne va-t-elle pas plus loin et ne touche-t-elle jamais la totalité des hématies, il est difficile de le dire avec certitude; néanmoins la labilité même de la cytase peut donner une explication satisfaisante. On observe aussi que la phagocytose se fait *in vitro*, mais d'une façon plus lente et plus incomplète que *in vivo*.

En injectant, dans le péritoine de cobayes, des substances comme la gluten-caséine, l'aleurone, le bouillon, la solution physiologique, on a, 18-24 heures après, des exsudats composés presque exclusivement de microphages (plus de 80 0/0). Ces

exsudats se sont montrés toujours incapables de la moindre action hémolytique, de même que les extraits de leucocytes centrifugés et lavés. L'addition du fixateur spécifique n'exerce aucune influence sur les extraits.

Après 36-48 heures, l'exsudat change et devient de plus en plus riche en macrophages. De tels exsudats provoquent une hémolyse quoique peu marquée.

Pour prouver que cette hémolyse est due à la macrocytase de ces macrophages, il aurait fallu en préparer des extraits; mais on se heurte à des difficultés : la quantité des exsudats est faible, et les macrophages du péritoine du cobaye supportent mal la centrifugation et le lavage, de sorte qu'il nous fut impossible d'avoir des extraits sûrement débarrassés du sérum d'exsudat et en quantité suffisante. C'est pourquoi nous nous sommes adressés à des lapins.

Pour avoir de bons exsudats, nous avons employé la gluten-caséine selon les indications données par Gengou[1].

18-24 heures après l'injection intrapleurale de 5 c. c. de gluten-caséine ou de l'émulsion d'aleurone à 5 0/0 dans le bouillon, on tue l'animal par saignée, on prélève l'exsudat dont la quantité varie de 2 à 10 c. c. et qui contient en grande majorité des microphages, plus de 80 0/0 et quelquefois même plus de 90 0/0. Les exsudats ainsi obtenus sont centrifugés et lavés 2-3 fois à l'eau physiologique. Puis, les leucocytes, additionnés de leur volume d'eau physiologique, sont congelés dans un mélange de glace et de sel marin et transportés dans de l'eau à 37°. Cette opération est répétée 2 ou 3 fois pour favoriser la destruction cellulaire et le passage de la cytase dans le liquide. On laisse ensuite cette émulsion macérer dans l'étuve à 37° pendant 14-24 heures, après quoi on examine les propriétés de ces extraits comparativement avec un volume égal de sérum additionné de son volume d'eau physio-

1. La poudre obtenue après broiement de gluten-caséine est ajoutée à la dose de 10 0/0 à une solution de KOH à 1/2 0/0 chauffée à 100°. Une demi-heure après, le mélange est transporté au bain-marie à 56°-60° pour 2-4 heures. On stérilise le liquide louche ainsi obtenu 2 ou 3 fois à 100° et on en injecte 4 à 5 c. c.

A propos de cette substance, il faut remarquer que sa composition et partant ses propriétés sont variables. Les échantillons en morceaux qui donnent, après les manipulations indiquées, un liquide louche, produisent de bons exsudats. Les échantillons en poudre, en se dissolvant complètement, donnent un liquide clair. L'injection d'un tel liquide ne provoque que des exsudats faibles au point de vue de la quantité et peu riches en cellules.

logique, avec du sérum d'exsudat, etc. Dans 10 expériences faites ainsi, nous n'avons jamais constaté la moindre action hémolytique par rapport aux globules d'oie, de poule et de cobaye. Cette absence d'hémolyse ne permet pas encore de conclure à l'absence de la cytase, elle peut y être contenue, mais en quantité insuffisante. Or l'addition du fixateur nous permet de déceler les quantités, même très faibles, des cytases. C'est pourquoi nous avons soumis à l'action de nos extraits différents globules en présence des fixateurs correspondants. Pour cela, on ajoute du fixateur spécifique à l'extrait et ensuite les hématies; ou on met d'abord les hématies pendant 2-3 heures à 37° au contact du sérum spécifique chauffé et on les transporte après le lavage dans les extraits. Dans 6 expériences faites de cette façon. il n'y a jamais eu d'hémolyse. D'autre part, pour nous assurer que ces extraits ont un pouvoir bactéricide, nous avons essayé, dans 3 cas, leur action vis-à-vis du coccobacille typhique et du vibrion cholérique ; ils se sont montrés, égaux ou même supérieurs aux sérums correspondants. Nous donnons ici le tableau complet d'une de nos expériences :

Un lapin reçoit le 6 mai à 4 heures, 5 c. c. de gluten-caséine dans chaque plèvre; le 7 mai, c'est-à-dire 18 heures après, il est saigné et on retire de la plèvre droite 8 c. c. d'un exsudat visqueux de couleur gris jaunâtre, qui donne après la centrifugation à peu près 3/4 c. c. de dépôt composé de 91 0/0 de polynucléaires et de 9 0/0 de mononucléaires. De la plèvre gauche, on retire 6 c. c. d'exsudat qui contient 89 0/0 de polynucléaires, et 11 0/0 de mononucléaires. Après avoir traité ces exsudats d'après le procédé décrit plus haut, on prépare pour l'étude des propriétés hémolytiques les mélanges suivants :

		A 6 h.	A 6 h. 1/2.	Le lendemain à 10 h. 1/2.
1) Extrait des leucocytes de la plèvre gauche....	5 parties.	0.	0	0 (même ap. 2 h. à 37°).
Emulsion des hématies d'oie....	1 partie.			
2) Même extrait.....	3 parties.	Agglutination + 0.	*Idem.*	*Idem.*
Sérum fixateur...	2 —			
Emulsion des hématies.........	1 partie.			

3) *Idem* que le 1, mais avec les leucocytes de la plèvre droite		0	0	0
4) *Idem* que 2 (les leucocytes de la plèvre droite).		Agglutination + O.	*Idem.*	*Idem.*
5) *Idem* que 1, mais avec les hématies de poule............		0	0	0
6) *Idem* que 3, avec les hématies de poule		0	0	0
7) Sérum du même lapin .... Hématies d'oie ...	5 parties. 1 partie.	Légère agglutination + O.	*Idem.*	*Idem.*
8) Sérum .... Fixateur .... Hématies.........	3 parties. 2 — 1 partie.	Agglutination + dissolution avancée.	Dissolution complète.	
9) Sérum .... Hématies de poule..........	5 parties. 1 partie.	Légère agglutination + traces de dissolution.	*Idem.*	Dissolution mais faible.
10) Sérum d'exsudat. Hématies d'oie ...	5 parties. 1 partie.	0	0	O, traces d'agglutinat.
11) Sérum d'exsudat. Fixateur.......... Hématies d'oie ...	3 parties. 2 — 1 —	Agglutination + O.	*Idem.*	*Idem.*
12) Sérum d'exsudat. Hématies de poule.	5 parties. 1 partie.	0	Légère agglutin. + O.	*Idem.*

Pour voir l'action bactéricide de ces extraits, nous nous sommes servi de la méthode des ensemencements successifs. Nous avons comparé l'extrait de leucocytes, le sérum d'exsudat et la solution physiologique, et nous avons vu qu'après 19 heures tous les germes (vibrion cholérique) ont été tués dans l'extrait, le sérum donna encore quelques colonies après 24 heures. Le sérum de l'exsudat et la solution physiologique se comportèrent d'une façon identique : le nombre des colonies après 24 heures a été innombrable.

Cette expérience, qui du reste peut être facilement répétée, est très démonstrative : l'extrait de polynucléaires, plus riche en microcytase que le sérum correspondant, ne contient pas de macrocytase ; non seulement il n'est pas globulicide par lui-même, mais il ne peut être activé par le fixateur spécifique ; tandis que le sérum correspondant l'est à un degré très prononcé. Il faut donc admettre qu'il existe une différence réelle entre les macrocytases et les microcytases.

Nous rappellerons ici que Schattenfroh [1] a déjà constaté

1. *Archiv. für Hygiene*, 1899, Bd. 35, p. 135-203, et *Münch. med. Woch.*, 1898 p. 353-359. Tout dernièrement, M. Gruber (*Münch. med. Woch*, p. 1965-1968) a parlé des expériences analogues aux nôtres ; lui non plus n'a pas réussi à activer les extraits des leucocytes par les hémofixateurs, On peut donc considérer ces faits comme établis d'une façon définitive

que les extraits polynucléaires très bactéricides ne sont pas hémolytiques et qu'il se prononça dans le sens de la non-identité des substances bactéricides des leucocytes et des substances globulicides des sérums. Si l'on pouvait réussir tout aussi facilement à obtenir chez le lapin des exsudats mononucléaires, la question de la dualité des cytases serait tranchée aussitôt avec une évidence absolue. Mais on se heurte à des difficultés qui ne permettent pas d'avoir des résultats nets et non susceptibles d'objections.

Ainsi, le procédé qui consiste à provoquer des exsudats macrophagiques par injections intrapleurales des globules rouges d'oie n'est pas applicable : les macrophages qui saisissent et digèrent ces hématies, emploient leur macrocytases à cette digestion. On sait bien par les expériences de Bordet (*l. c.*) que la quantité de cytases n'augmente pas d'une façon tant soit peu sensible pendant l'immunisation. Ce fait qui doit être mis au moins en partie sur le compte de la fixation de la cytase par les éléments sensibles, nous indique pourquoi l'étude des exudats ainsi obtenus, ne peut pas donner de résultats probants.

D'autre part, en injectant la gluten-caséine et l'émulsion d'aleurone, on a, après 48-72 heures, des exsudats très peu abondants dans lesquels la plupart des leucocytes se trouvent dans les petits blocs fibrineux formant presque la totalité de l'exsudat. En faisant des frottis de ces blocs on trouve aussi bien des mono que des polynucléaires, en proportion de 50-60 de mononucléaires pour 40-50 de polynucléaires. Avec un tel exsudat, après avoir trituré ces blocs et les avoir traités par la méthode de Buchner, nous avons obtenu une dissolution très incomplète de globules de poule : cette dissolution est activée par le fixateur. Mais il y a eu coagulation (puisqu'il y a eu de la fibrine), destruction des leucocytes différents, toute une série de phénomènes qui ne permettent pas de savoir exactement d'où proviennent les cytases en pareils cas, c'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi ces expériences.

Le sérum de chien est doué de propriétés hémolytiques assez considérables, il était donc tout indiqué de chercher dans ses leucocytes la présence de la macrocytase.

Les exsudats à polynucléaires ont été obtenus dans la plèvre par la gluten-caséine et par l'aleurone, et sous la peau, par le nitrate d'argent.

Les extraits préparés avec des leucocytes ainsi obtenus, aussi bien des exsudats sous-cutanés (3 expériences), que des exsudats pleuraux (5 expériences), se sont montrés toujours incapables de produire l'hémolyse, même quand on leur ajoutait des fixateurs spécifiques, d'après le procédé indiqué à propos des extraits polynucléaires de lapin. Ils possédaient en même temps un pouvoir bactéricide vis-à-vis du coccobacille typhique et du vibrion cholérique et encore d'autres propriétés, comme, par exemple, celle de dissoudre la gélatine. Donc, chez le chien, ce ne sont très probablement pas les polynucléaires, producteurs de la microcytase du sérum, qui lui communiquent son pouvoir hémolytique si marqué.

Nous avons employé ensuite les injections sous-cutanées de l'essence de térébenthine. Les 2 premiers jours après l'injection, on n'a qu'une faible quantité de sérosité avec peu d'éléments cellulaires. C'est au 3e et surtout au 4e jour, que l'on peut obtenir du pus en quantité quelquefois très considérable (50 c. c. et plus). Ce pus épais, jaunâtre, contient, à côté des débris du tissu nécrosé, beaucoup de cellules détruites dont il est difficile de déterminer la nature exacte, puis une grande quantité de mononucléaires. Tous les globules bien reconnaissables sont à un seul noyau. Étant donnée la propriété que possède l'essence de térébenthine de produire l'hémolyse, nous avons eu soin de laver la partie solide de nos exsudats jusqu'à 6 fois (en centrifugeant et en enlevant avec une pipette la partie liquide chaque fois) pour éloigner toute trace d'essence. Après le dernier lavage, le résidu solide était additionné de son volume d'eau physiologique (toujours à 0,85 0/0) et traité par la méthode de Buchner. Sur 9 chiens, nous avons pu avoir 5 fois des exsudats dans les conditions décrites, les autres fois les exsudats ont été hémorragiques, ou ne contenaient pas de globules libres; on avait un bloc du tissu mortifié au lieu d'exsudat, etc. Sur ces 5 exsudats, 2 se sont montrés nettement hémolytiques presque au même degré que le sérum sanguin, tandis que dans 3 cas cette action a fait défaut. Étant donnée cette inconstance des résultats, nous ne nous permettrons d'en tirer aucune conclusion ferme. Mais puisque nous avons pris toutes les précautions pour éviter les causes d'erreurs dans les résultats positifs, et puisque avec les exsudats

microphagiques nous n'avons jamais obtenu d'hémolyse, nous ne pouvons considérer ces faits comme n'ayant pas de signification, et ceci d'autant plus que les organes macrophagiques eux-mêmes ne sont pas toujours actifs. Peut-être la macrocytase dans les extraits inactifs aura-t-elle pu passer, par suite d'avarie des cellules, dans le liquide de l'exsudat; peut-être a-t-elle été employée en entier pour la digestion des cellules mortes de la collection purulente. A ces questions, il nous est impossible de répondre quant à présent. Nous comptons poursuivre les recherches dans cette direction, afin de mieux élucider la question.

Voici les détails d'une de nos expériences. Un chien reçoit sous la peau, de chaque côté, 1 c. c. d'essence de térébenthine. Trois jours après, on lui injecte dans chaque plèvre 10 c. c. de gluten-caséine. Vingt-quatre heures après cette injection intrapleurale, il est saigné à blanc, on retire de 2 abcès sous-cutanés jusqu'à 100 c. c. de pus épais, crémeux, jaunâtre, sentant la térébenthine. Toutes les cellules reconnaissables sont à un seul noyau. Ce pus, après 6 lavages, est traité comme il a été décrit. De la plèvre droite, on retire 20 c. c. d'exsudat contenant 93 0/0 de polynucléaires; de la plèvre gauche, 15 c. c. avec 82 0/0 de polynucléaires. Ces exsudats sont traités comme plus haut avec cette différence qu'on ne les lave que 2 fois. Avec les extraits obtenus on fait les mélanges suivants, dont on fait aussi des préparations en chambre humide pour le contrôle microscopique.

Les mélanges sont préparés à 2 h 30.		A 2 h. 3/4.	A 3 h. 1/2.	A 4 h.	A 6 h.	Le lendemain.
1) Sérum de chien... Emulsion des hématies d'oie....	5 p. 1 p.	Agglutination légère.	Dissolution commençante.	Un peu plus.	Dissolution à moitié.	Dissolution complète.
2) Même sér. chauffé. Hématies.........	5 p. 1 p.	Agglutination légère.	*Idem.*	*Idem.*	*Idem.*	Agglutination + 0.
3) Extrait de polynucléaires......... Hém. d'oie.......	5 p. 1 p.	Agglutination légère.	*Idem.*	*Idem.*	*Idem.*	*Idem.*
4) Sérum de cet exsudat............ Hém. d'oie........	5 p. 1 p.	Agglutination légère.	*Idem.*	*Idem.*	*Idem.*	*Idem.*
5) Eau de lavage de polynucléaires.. Hém. d'oie.......		0	0	0	0	0

6) Sérum de l'exsudat mononucléaire.. 5 p. Hém. d'oie........ 1 p.	Agglutination légère.	Commencement de dissolut.	*Idem.*	Dissolut. moins qu'à moitié.	Diss. plus qu'à moitié, mais incompl.
7) Eau de lavage de mononucléaires. 5 p. Hém. d'oie........ 1 p.	0	Quelques traces de dissolut.	*Idem.*	*Idem.*	La dissolution reste ébauchée.
8) Eau de 2e lavage.. 5 p. Hém. d'oie........ 1 p.	0	0	0	0	0
A 3 h.					
9) Extrait de mononucléaires .... 5 p. Hém. d'oie........ 1 p.		Dissolution commençante.	*Idem.*	Dissolution à moitié.	Dissolution complète.

L'extrait de mononucléaires, après le chauffage pendant une demi-heure à 65°, a perdu ses propriétés dissolvantes. Dans une autre expérience calquée sur celle-ci, l'extrait de l'exsudat se montra même plus actif puisqu'il nous donna, en proportion de 5 : 2, une dissolution complète en 24 heures; le chauffage à 57° pendant 30 minutes a aboli presque complètement son action. Il est à noter que, dans 3 expériences où l'hémolyse n'a pas eu lieu, l'action du sérum de l'exsudat (malgré la présence de la térébenthine) ne se montra que très faible ou même nulle. Ceci montre que l'on ne peut expliquer les résultats positifs par l'action de l'essence de la térébenthine, et rend probable notre hypothèse de la destruction possible de la macrocytase.

Il faut remarquer encore que, dans les cas positifs, le sérum d'exsudat qui contenait de l'essence de térébenthine a été plus faiblement hémolytique que l'extrait leucocytaire.

Pour étudier l'action des exsudats chez les animaux préparés par les injections des hématies, nous nous sommes adressé de nouveau à des cobayes.

Quand on injecte dans le péritoine d'un animal immunisé des hématies suspendues dans de l'eau physiologique, on voit, au lieu d'une phagocytose très lente exclusivement par des mononucléaires et d'une dissolution extracellulaire nulle, des phénomènes tout différents. La phagocytose est très rapide; les polynucléaires y prennent une part presque aussi active que les macrophages. Cette phagocytose se fait à la manière des amibes par de grands pseudopodes et non pas selon le mode des Vampyrelles. Ceci a été déjà décrit par M. Metchnikoff. En même temps, la destruction humorale des hématies est toujours bien prononcée. On pourrait croire, au premier abord, à la présence d'une cytase libre dans le plasma de l'exsudat. Mais une pareille

opinion ne peut pas être soutenue, étant donné que les injections intrapéritonéales provoquent toujours un certain degré de phagolyse et partant le passage dans le plasma des ferments endoleucocytaires. Il suffit de préparer le péritoine par des injections préalables de liquides comme le bouillon, la solution physiologique, etc., et d'employer ensuite les émulsions des hématies à la température de 37° afin d'entraver, autant que possible, la phagolyse, pour que la destruction extracellulaire soit réduite à un minimum négligeable. Tels sont les faits observés *in vitro*.

En mélangeant les exsudats prélevés chez ces animaux avec les hématies et en observant ces mélanges en gouttes suspendues, on trouve les mêmes phénomènes : d'une part, la destruction extracellulaire due à l'avarie d'un certain nombre de leucocytes; de l'autre, une phagocytose s'accomplissant à vue d'œil. Quelques minutes suffisent pour amener un englobement complet de toutes les hématies intactes et aussi de celles qui ont déjà perdu leur hémoglobine, tandis qu'avec les leucocytes des animaux neufs, il faut une journée entière et même plus, *in vivo*. *In vitro*, les leucocytes neufs ne phagocytent que lentement et seulement en partie. La majorité des hématies restent libres. Pourquoi cette exagération des fonctions phagocytaires? S'agit-il ici, pour ainsi dire, d'une éducation des leucocytes ou d'une influence stimulante de la part des fixateurs qui, comme on sait, circulent librement dans les humeurs des animaux préparés. Pour répondre à cette question, nous avons fait une série d'expériences suivantes : nous injections à des cobayes des globules chargés de fixateurs spécifiques ou nous faisions à des animaux neufs des injections d'hématies et de sérums spécifiques chauffés, simultanément, avant et après celle des hématies.

Dans ces cas, les phénomènes observés ont été identiques à ceux déjà décrits. Nous prenions ensuite des leucocytes chez les animaux neufs et les mélangions à des globules sensibilisés *in vitro* : même effet. Enfin, nous nous sommes servi de leucocytes pris chez des animaux injectés préalablement avec des sérums hémolytiques chauffés. On lavait les leucocytes pour les débarrasser du fixateur qui pouvait être présent dans le liquide et on les mettait en contact avec des hématies. La phagocytose, quoique moins énergique que dans le cas précédent, a eu neán-

moins lieu. L'influence stimulante des fixateurs sur la fonction phagocytaire est donc bien évidente.

L'apparition du travail de M. Sawtchenko qui a obtenu les mêmes résultats et leur a ajouté d'autres non moins intéressants, nous a fait abandonner les expériences dans cette direction.

Nous ne les enregistrons que dans le but de confirmer ce fait important.

Puisque chez les animaux préparés, les polynucléaires sont tout aussi capables, ou à peu près, de phagocyter les hématies que les macrophages, on pourrait conclure que chez eux les exsudats différents devraient se comporter vis-à-vis des hématies d'une façon identique. Eh bien, l'observation nous montre le contraire; malgré cette faculté qu'acquièrent les microphages d'englober les hématies, les exsudats à polynucléaires sont tout de même de beaucoup inférieurs à ceux à macrophages, quant à leur pouvoir hémolytique. Nous avons fait beaucoup d'observations à ce sujet, nous en exposerons quelques-unes avant d'en tirer les conclusions.

1. Chez un cobaye immunisé dont le sérum dissout les hématies d'oie en proportion de 3 : 1 en 4 heures, on provoque, par l'injection de bouillon, un exsudat qui contient 22 heures après l'injection, 68 0/0 de polynucléaires. Cet exsudat est congelé tel quel et mélangé avec des hématies en proportion de 5 : 1. Aucune hémolyse. Même 36 heures après, il n'y a que des traces de dissolution. On attend encore 18 heures, on retire de l'exsudat avec 79 0/0 de mononucléaires. Cet exsudat commence à agir au bout de 15 minutes, et 24 heures après, la dissolution est complète.

2. Chez les 2 cobayes dont les sérums sont hémolytiques en proportion de 1 : 1 (le premier donne la dissolution complète en 10, l'autre en 20 minutes), les exsudats mononucléaires sont aussi actifs; chez le premier, nous avons à la même proportion une hémolyse complète après 24 heures, chez l'autre presque complète en même temps.

3. A un cobaye préparé, on injecte 5 c. c. de solution physiologique; 1/2 heure après, on retire de l'exsudat qui contient très peu d'éléments cellulaires. Ceci ne doit pas nous étonner; le manque d'éléments cellulaires est dû à la phagolyse. Ce liquide dissout les hématies d'oie en proportion de 5 : 1 en une demi-heure.

4 heures après, on reprend de l'exsudat contenant encore peu d'éléments, mais surtout des polynucléaires et quelques lymphocytes. Cet exsudat, même en 20 heures, ne donne que des traces de dissolution; 23 heures après, on retire de l'exsudat avec 70 0/0 de polynucléaires et 30 0/0 de mononucléaires. Cet exsudat hémolyse en 5 heures.

24 heures après, on reprend de l'exsudat avec 85 0/0 de mononucléaires, il hémolyse en 15 minutes.

L'animal est laissé en repos; deux jours après, il est de nouveau injecté avec 5 c. c. d'aleurone; 18 heures après, on retire un exsudat avec 62 0/0 de polynucléaires. Cet exsudat demande 5 heures pour que l'hémolyse soit complète.

4. Un autre cobaye immunisé dont le sérum hémolyse en proportion de 5 : 1 en 20 minutes, donne 16 heures après l'injection d'aleurone un exsudat très épais, riche en cellules presque exclusivement polynucléaires (95 0/0). Cet exsudat ne donne au bout de 29 heures que des traces d'hémolyse.

On voit ainsi que, si le pouvoir hémolytique des exsudats est toujours inférieur à celui du sérum correspondant, il est néanmoins nettement en rapport avec la quantité de macrophages; plus il y en a, plus l'exsudat est actif. Certes, on peut faire l'objection qu'avec les changements de la teneur des exsudats en ces deux espèces de leucocytes, il se passe aussi d'autres changements. La constance des rapports indiqués n'en constitue pas moins un fait qui s'ajoute à tant d'autres, déjà énumérés, comme une nouvelle preuve des rapports étroits qui existent entre les fonctions des macrophages et les processus hémolytiques.

Malgré toutes les difficultés qu'on a pour préparer des extraits des exsudats péritonéaux à mononucléaires chez les cobayes, nous avons réussi dans 2 cas à avoir des extraits macrophagiques actifs, quoique faiblement.

Tous ces faits, malgré les lacunes qui existent dans nos expériences et que nous avons eu soin d'indiquer au cours de notre exposé, nous permettent de conclure à l'existence d'une différence entre les ferments digestifs des deux espèces de leucocytes, entre leurs cytases; d'autant plus que beaucoup d'autres considérations parlent dans le même sens. Ainsi les macrophages et les microphages ont une origine diverse; les premiers proviennent,

comme ceci a été établi par M. Ehrlich, des ganglions lymphatiques et de la rate, tandis que les polynucléaires ont leur source principale dans la moelle osseuse.

Ces organes eux-mêmes ont aussi des propriétés différentes au point de vue qui nous occupe. Les différences morphologiques et chimiques, les dernières prouvées par les réactions des protoplasmas vis-à-vis des substances colorantes, sont aussi bien nettes. Enfin, les fonctions remplies par les leucocytes sont loin d'être identiques. Les microphages, sans toucher aux cellules animales, saisissent et digèrent vite les microbes; les macrophages, au contraire, très énergiques vis-à-vis des cellules animales, ont des fonctions phagocytaires beaucoup moins prononcées vis-à-vis des microbes. Quelquefois, ils ne les englobent pas du tout; dans d'autres cas, après les avoir phagocytés, ils ne les digèrent que lentement. Ils peuvent même devenir en dehors de l'organisme de véritables milieux de culture pour les microbes englobés. On a donc un nombre considérable de preuves en faveur de la théorie de deux cytases.

Il serait très intéressant de pouvoir dissocier les deux cytases, celle des macrophages et celle des microphages, dans du sérum sanguin. Les procédés de fixation, employés jusqu'à présent, n'ont pas permis, comme nous avons vu par l'exposé des travaux relatifs à ce sujet, de trancher cette question. Avec les eléments chargés de fixateurs, on prive un sérum de toutes ses cytases (ou de toute sa cytase); sans employer les fixateurs, on ne parvient pas à enlever toute la cytase même à l'aide des éléments sensibles, au moins dans beaucoup de cas. Ceci nous explique, en grande partie, les divergences de vues des auteurs cités plus haut. Il faut chercher un autre procédé. Nous avons essayé le procédé suivant : si on injecte dans les veines d'un animal des substances comme la peptone, on provoque une leucocytose considérable. Eh bien, en déterminant, d'une part, le pouvoir bactéricide et le pouvoir hémolytique d'un sérum, et de l'autre, le nombre et l'espèce de leucocytes avant et après ces injections, on pourrait peut-être tirer quelques indications utiles. Malheureusement, les données que nous avons obtenues chez les animaux ainsi traités (4 lapins), ne nous ont pas avancé beaucoup. Il y a dans ces cas une leucocytose et il paraît y avoir une augmentation de la teneur du sérum en cytase ; mais

elle porte à la fois sur le pouvoir hémolytique et le pouvoir bactéricide.

Ceci n'a rien d'étonnant puisque si le nombre des microphages augmente, il faut compter aussi avec l'augmentation du nombre des macrophages. Et du reste, il est presque impossible de réaliser des expériences de ce genre avec une exactitude qui permettre d'en apprécier tous les détails et d'en tirer des conclusions fermes. Les différences que l'on trouve, sont souvent dans les limites d'erreurs possibles. En nous résumant, nous pouvons poser les conclusions suivantes :

1. Chez les animaux sur lesquels nous avons expérimenté (cobaye, lapin, chien), seuls les organes macrophagiques (épiploon, ganglions mésentériques, rate) et les glandes digestives possèdent des propriétés dissolvantes.

Tous les autres organes, y compris la moelle osseuse, source principale des microphages, sont dénués de tout pouvoir hémolytique. Quant au pouvoir bactéricide, c'est l'inverse qui paraît avoir lieu ; les ganglions du mésentère ne contiennent pas de quantités appréciables de microcytase.

2. Les extraits de microphages sont bactéricides et ne sont pas hémolytiques : même, l'addition d'un hémofixateur spécifique n'est pas capable de les activer. C'est le contraire qui a lieu pour les extraits de macrophages. Il est à remarquer que, par suite des difficultés techniques concernant l'obtention d'exsudats et d'extraits macrophagiques, cette proposition ne peut pas être exprimée d'une façon aussi affirmative que celle concernant les extraits microphagiques.

3. Les propriétés respectives des organes et des exsudats macrophagiques et celles des organes et des exsudats microphagiques doivent être attribuées à deux cytases différentes ; la macrocytase active vis-à-vis des cellules animales dans le premier cas et la microcytase active vis-à-vis des microbes dans le second ; ces deux cytases ne passent dans les humeurs que par suite de la destruction des leucocytes correspondants.

4. Les fixateurs possèdent la propriété d'activer la phagocytose *in vivo* aussi bien qu'*in vitro*.

Quoique se trouvant en partie à l'état de liberté dans les plasmas, les fixateurs doivent être considérés aussi comme des ferments provenant des leucocytes et des organes macrophagiques.

RECHERCHES SUR LES LÉSIONS VASCULAIRES

PROVOQUÉES PAR LES TOXINES DIPHTÉRIQUES

Par le Dr KOMOTZKY

AVEC LES PLANCHES I ET II.

Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.

Les investigations des auteurs ont, depuis longtemps déjà, porté sur les lésions vasculaires provoquées par les maladies infectieuses et divers empoisonnements, comme, par exemple, l'alcoolisme chronique.

De longue date, les lésions vasculaires fréquemment remarquées chez les vieillards, même lorsque l'on ne trouvait dans les antécédents de ces sujets ni maladie infectieuse plus ou moins longue, ni intoxication chronique quelconque, ont attiré l'attention des cliniciens ; mais, en ces derniers temps seulement, ces lésions vasculaires ont été l'objet de recherches histologiques.

D'un autre côté, la présence dans l'intestin de l'homme d'une grande quantité de microorganismes, rend plausible cette hypothèse, que les parois des vaisseaux ne restent pas indifférentes à l'égard des produits des échanges de ces microorganismes.

Alors que les altérations du système nerveux central, provoquées par l'injection des poisons, ont depuis longtemps déjà attiré l'attention des auteurs, aucun travail n'a encore été consacré à l'étude des lésions provoquées par les mêmes causes.

Aussi, le professeur Metchnikoff, à qui nous avons demandé de bien vouloir nous indiquer un sujet de recherches, nous a-t-il proposé d'étudier les modifications des vaisseaux que provoquent chez les animaux les injections de toxines bactériennes, et de commencer ces recherches par l'injection de toxines diphtériques.

Au début de nos expériences, nous étions embarrassé par le choix des doses à injecter. Il semblait que l'intérêt principal de ces expériences devait se concentrer sur celles faites avec de

très petites doses, capables de provoquer chez les animaux l'intoxication chronique, mais en même temps assez élevées pour ne pas être indifférentes à l'organisme animal. En injectant des toxines très diluées, on risquait de ne pas provoquer des altérations et de perdre beaucoup de temps.

Les recherches expérimentales n'ayant pas encore été faites jusqu'à présent dans ce sens, il était également intéressant de savoir quelles étaient les lésions provoquées par de fortes doses de toxines introduites dans l'organisme animal.

D'un autre côté, en expérimentant sur un grand nombre d'animaux, nous comptions en trouver peu, il est vrai, qui pourraient résister à des doses de toxines répétées et relativement élevées.

1/50e de centimètre cube de toxine diphtérique dont nous nous servions, injecté sous la peau, tuait un lapin de 1,500 grammes en l'espace de 3 à 5 jours : les doses injectées oscillaient entre 0,02 et 0.01 de centimètre cube. La pureté de la toxine était contrôlée à l'aide d'ensemencements sur l'agar-agar, répétés tous les mois. Les injections étaient faites sur des lapins, soit dans le tissu cellulaire de la peau abdominale, soit dans les veines des oreilles, à l'aide d'une seringue stérilisée. La dilution de la toxine aux degrés voulus était faite avec la solution physiologique stérilisée de sel marin. Après la mort de l'animal en expérience, on ensemençait 1 à 2 gouttes du sang du cœur sur l'agar-agar.

L'examen microscopique portait sur des fragments de 1/2 c. c. de rate, de foie, de rein, de poumon, du cœur, ainsi que sur les gros vaisseaux émergeant du cœur. Les pièces étaient durcies, tantôt dans un mélange à parties égales d'une solution de bichromate de potasse à 4 0/0 et de formaline du commerce à 20 0/0, tantôt dans une solution de formaline à 10 0/0, additionnée d'acide chromique, dans la proportion de 1/6 à 1/10 0/0.

Les deux mélanges étaient chaque fois préparés au moment de s'en servir. Les fragments, d'abord lavés, étaient ensuite placés dans de l'alcool de concentration croissante et finalement dans de l'alcool absolu, puis traités par le chloroforme chauffé à 40° et portés dans la paraffine molle, refroidie jusqu'à la solidification à peine commençante.

Ensuite, après les avoir laissés à l'étuve pendant une ou deux

heures, on plaçait les fragments à examiner dans de la paraffine solide, où ils restaient encore une ou deux heures.

La recherche de la graisse était faite à l'aide de la liqueur de Flemming.

Nous avons examiné au microscope les organes de 20 lapins dont le sang s'est montré à l'ensemencement absolument stérile.

Les animaux en expérience avaient succombé de 3 à 19 jours après l'injection. Quinze lapins reçurent une seule injection; quatre reçurent deux et un trois injections.

Dans tous ces cas, nous avons constaté une réaction inflammatoire des vaisseaux, se traduisant par leur dilatation considérable, parfois même excessive et par leur hyperhémie. Dans un grand nombre de cas, l'augmentation du nombre des globules blancs était tellement prononcée dans les vaisseaux des viscères, qu'on pouvait même sans numération précise parler de leucocytose. Dans 18 cas, on pouvait, en outre, constater l'augmentation du nombre des polynucléaires à protoplasma finement granuleux et se colorant par l'éosine en un rouge plus ou moins vif. Dans certains cas, le nombre de ces pseudoéosinophiles était tellement considérable, qu'il fallait admettre que le protoplasma de presque tous les polynucléaires avait subi une métamorphose appropriée.

Il s'agissait de savoir si cette altération de protoplasma constituait une réaction spécifique des leucocytes vis-à-vis de la toxine diphtérique. Dans ce but, on injecta à un lapin un c. c. du même bouillon (bouillon Martin), qui servait à la préparation de la toxine dont nous nous étions servi. Le lapin fut tué le 5e jour: l'examen des organes ne permit pas d'y reconnaître une anomalie quelconque.

Dans les cas où l'hypérémie était particulièrement prononcée, il y avait en même temps des phénomènes d'œdème de l'adventice des parois vasculaires; les fibres en étaient dissociées; entre elles, se trouvait un liquide albuminoïde coagulé; dans les mêmes points, les noyaux des cellules connectives ne fixaient point ou fixaient à peine les matières colorantes.

Très souvent on notait aussi, dans ces cas d'hyperhémie très marquée, la rupture des glomérules de Malpighi, avec extravasats consécutifs.

Les lésions de dégénérescence consistaient en une très faible

dégénérescence graisseuse de l'endothélium vasculaire. Nous n'avons pas constaté d'hyalinisation bien nette de l'adventice notée par les auteurs chez les sujets ayant succombé à la diphtérie.

A côté des lésions déjà décrites, nous avons constaté, dans 12 cas, de l'infiltration de la paroi vasculaire par des globules blancs; six fois il s'agissait de polynucléaires (pseudoéosinophiles), infiltrant les parois des vaisseaux hépatiques et six fois, d'infiltration de vaisseaux rénaux par de petites cellules rondes. La survie, après l'injection des animaux dans les reins desquels nous avons constaté ces infiltrations, était de 3, 4, 6, 8 et 9 jours; le 6e lapin qui, 8 jours après la première injection sous-cutanée de 1/100 c. c. de toxine reçut la même dose, par la même voie, survécut 15 jours.

Ces infiltrations de petites cellules étaient disposées exclusivement sur le trajet des veines, en intéressant la partie externe de l'adventice artérielle, quand celle-ci adhérait intimement à la veine. Les foyers d'infiltrations les plus étendus se trouvaient dans le rein du lapin qui a vécu 15 jours après avoir reçu deux injections; il en est de même du nombre d'infiltrations constaté sur la coupe.

Dans 2 des 6 cas où l'on a rencontré ces infiltrations, on notait, à côté de petits éléments mononucléaires, quelques polynucléaires (pseudoéosinophiles). La figure 4 de la planche n° 1 représente un petit foyer de cette infiltration mixte (grossissement faible). La figure 5 représente le même foyer, examiné à l'immersion.

En examinant minutieusement ces infiltrations de petites cellules qui apparaissent si vite après l'injection de la toxine, on voit qu'elles sont formées par une agglomération de cellules rondes variant peu dans leurs dimensions et dont le noyau, petit et fortement coloré, est entouré d'un anneau protoplasmique très étroit. Parfois ces cellules sont tellement serrées les unes contre les autres qu'il devient impossible de distinguer les limites de leur protoplasma. Ailleurs elles sont plus disséminées entre les fibres connectives qui les séparent.

Près des veines dont les parois sont plus minces (planche 1, fig. 2), ces cellules sont particulièrement serrées les unes contre les autres, tandis que dans les veines à parois plus épaisses les

cellules infiltrantes sont plus disséminées et séparées les unes des autres par des fibres connectives (planche 1, fig. 3).

Si la production de ces infiltrations était due à la transformation des cellules connectives, elles auraient dû atteindre le maximum d'intensité dans les parois connectives épaisses; or, en réalité, ces infiltrations sont également prononcées dans les parois des veines, formées à peine par quelques fibres connectives (planche 1, fig. 1 et 2).

En raison de ce que nous venons de dire, en prenant, d'autre part, en considération ce fait, que les infiltrations en question se montrent déjà le troisième jour après l'injection, et que l'on y constate la présence des polynucléaires (pseudo-éosinophiles), qui sont incontestablement des éléments morphologiques du sang, il faut admettre que ces infiltrations se forment grâce à la migration des lymphocytes du torrent sanguin. En examinant, d'autre part, les cellules connectives entre lesquelles sont disposés les petits éléments ronds de l'infiltration, on ne constate pas de formes que l'on pourrait considérer comme des formes de passage de la cellule connective en une petite cellule ronde.

Les infiltrations de petites cellules rondes ont été observées, jusqu'à présent, dans les processus inflammatoires chroniques; or, les mêmes lésions ont été notées bientôt après l'injection de la toxine.

Aussi, peut-on se demander si cette infiltration ne traduit pas la réaction inflammatoire contre les portions toujours renouvelées de toxines, élaborées par les microorganismes qui provoquent un processus inflammatoire chronique. Ainsi, nous l'avons déjà dit, dans six cas nous avons constaté, dans les vaisseaux du foie, une infiltration de la paroi vasculaire par des polynucléaires (pseudo-éosinophiles).

La fig. 6 de la planche 2 représente un de ces cas où l'infiltration est particulièrement abondante, la coupe étant examinée à un faible grossissement; la fig. 7 de la planche 1 représente une partie de cette infiltration examinée à l'immersion. A un examen plus détaillé de ces infiltrations, on constate que les polynucléaires (pseudo-éosinophiles) sont disposés entre les fibres connectives dissociées de la paroi vasculaire et infiltrent, en même temps, le parenchyme hépatique péri-vasculaire.

Ici, les polynucléaires infiltrent les parois des veines, de

même que les petites cellules rondes infiltrent les parois des veines du rein.

L'infiltration occupe exclusivement la paroi de la veine sus-hépatique et ne s'observe jamais dans celle de la veine porte.

Si la lésion frappe en premier lieu les veines, c'est très probablement parce que leurs adventices très minces et très lâches présentent, comparées à la paroi des artères, des conditions plus favorables aux mouvements amœboïdes des leucocytes.

En effet, les parois des veines sus-hépatiques sont beaucoup plus minces et leur texture est beaucoup plus lâche que celle des parois des veines portes.

Nous n'avons constaté aucune altération des vaisseaux coronaires ni des gros vaisseaux de la base du cœur, sauf dans un cas. Il s'agissait du lapin qui reçut deux injections à un intervalle de 8 jours et qui survécut 15 jours. Nous avons observé dans ce cas une accumulation de leucocytes autour des artères coronaires, mais la présence d'un grand nombre de globules rouges, à côté de ces leucocytes, montrait qu'il s'agissait d'extravasats sanguins.

Dans les parois des vaisseaux pulmonaires nous n'avons constaté aucune altération.

Dans la rate nous avons observé des faits, peut-être, moins importants au point de vue pathologique, mais qui sont intéressants au point de vue anatomique car ils touchent à la question encore discutée du système vasculaire de cette glande.

Nous avons notamment pu constater dans plusieurs des rates examinées, une hyperhémie parfois excessive, en même temps que les éléments propres de la pulpe disparaissaient presque complètement dans ces régions si hyperhémiées.

Dans un cas, on ne voyait que les follicules entourés de sang de toutes parts, tandis que les éléments propres de la pulpe y étaient disséminés sous forme de quelques exemplaires.

Par contre, on voyait très nettement dans ces mêmes régions très hyperhémiées, les cellules endothéliales fixées entre elles et formant ainsi des tractus disposés, soit parallèlement les uns aux autres, soit formant des anneaux ou des ovoïdes réguliers (planche 2, fig. 9). Cette régularité est d'autant plus marquée, que le segment donné de la rate est plus riche en sang (planche 2, fig. 8). L'examen attentif de cette disposition régulière des

endothéliums unis les uns aux autres fait supposer que ces formations représentent peut-être le réseau capillaire de la rate.

Etant donnée la facilité relative avec laquelle se rompt la paroi endothéliale des glomérules du rein, il faut admettre que, sous l'influence de l'hypérhémie, un grand nombre de ces tractus endothéliaux de la rate se sont rompus, mais qu'à l'état normal la régularité de ces formations est encore plus nette.

Ces tableaux démontrent qu'il existe dans la rate un certain nombre d'endothliums très fortement unis les uns aux autres et régulièrement disposés, même lors qu'il existe une hyperhémie extrêmement marquée. Aussi, est-il probable que ces cellules endothéliales, liées entre elles, forment les parois des capillaires spléniques ; tous les autres éléments de la pulpe sont plus ou moins lâchement fixés les uns aux autres, ainsi qu'aux capillaires, et, dans certaines conditions, ces éléments de la pulpe splénique peuvent, en quantité considérable, être éliminés de la rate et être déversés dans le sang.

Ces recherches terminées, nous avons fait des expériences analogues avec la toxine du botulisme, et nous avons obtenu des résultats semblables à ceux que nous ont donné les injections de toxine diphtérique. Ces recherches n'étant pas encore complètement terminées, nous les publierons sous peu.

En terminant notre travail, nous considérons comme un devoir d'exprimer notre respectueuse reconnaissance au professeur Metchnikoff pour avoir bien voulu nous recevoir dans son laboratoire, nous avoir fourni le sujet de nos recherches et s'y être vivement intéressé. Nous adressons également nos vifs remerciements au docteur Besredka qui a eu l'obligeance de nous aider dans notre travail.

MODIFICATIONS LEUCOCYTAIRES DANS LA PESTE BOVINE

Par le Dr RÉFIK-BEY

Nous avons étudié, sur les conseils et sous la direction du Dr Nicolle, les variations des leucocytes chez un grand nombre de bovidés soumis à l'infection expérimentale mortelle, ainsi que dans les quelques cas particuliers suivants : animal guéri de la maladie inoculée, animal vacciné par la bile, animaux vaccinés par le sérum, animal hyperimmunisé avec le lavage péritonéal[1].

Avant de présenter le résultat de nos recherches, nous mentionnerons que le nombre des globules blancs, chez les bovidés normaux, oscille entre 7,000 et 11,000 environ par mm. c. Le nombre des mononucléaires et des lymphocytes réunis varie de 4,500 à 6,500 environ par mm. c.; celui des polynucléaires de 1,500 à 3,500 environ. On voit donc que les premiers l'emportent toujours sur les seconds; leur proportion atteint, selon les cas, de 57 à 84 0/0 de la quantité totale. Les chiffres précédents sont basés sur de nombreux examens. Ajoutons que les éosinophiles peuvent faire défaut chez les bovidés, mais le fait demeure exceptionnel (voir, comme exemple, la courbe n° 5); lorsqu'ils existent, leur proportion varie énormément. Quant aux basophiles, ils se montrent inconstants et restent à l'état d'unités dans les cas positifs.

Il va sans dire qu'aucun des animaux qui ont servi à notre travail n'offrait d'hématies infectées par le *piroplasma bigeminum*.

MODIFICATIONS LEUCOCYTAIRES DANS L'INFECTION MORTELLE

Chiffre total des leucocytes. — On observe, le plus souvent, une augmentation initiale, suivie d'une diminution, puis d'une augmentation; ces deux dernières constantes.

Augmentation initiale. — Elle a lieu le 2e ou le 3e jour, époque où l'on a pu compter jusqu'à 18,300 globules par mm. c. Le nombre commence à baisser le 4e jour, parfois le 3e.

Diminution. — Le minimum est atteint le 5e jour, quelquefois le 4e, exceptionnellement le 6e ou le 7e. Le chiffre le plus bas que nous ayons noté correspondait à 2,000 leucocytes par mm. c. Le minimum leucocytaire s'observe généralement le jour de l'élévation thermique, rarement la veille, parfois le 2e ou le 3e jour de la fièvre.

1. Pour ce procédé d'hyperimmunisation, voir *An. Inst. Past.* XV, p. 728.

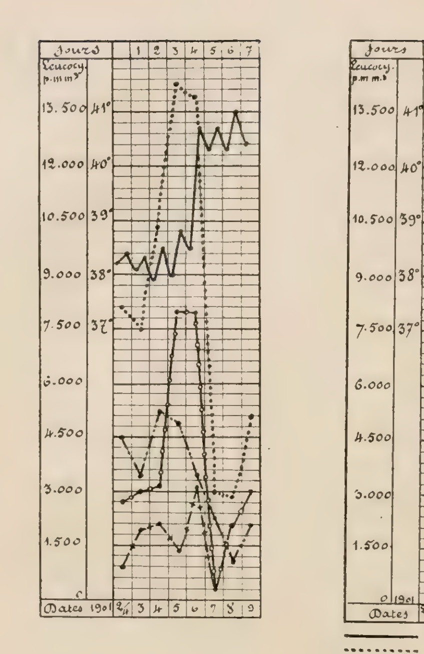


Fig. 1. — Animal d'Anatolie, âgé de 8 mois (N° 74-112). Reçoit, le 25 mars 1901, 5 c. c. de virus — signes et lésions classiques, sacrifié le 9e jour.

Fig 2. — Animal de Crimée, âgé d'un an (N° 74-167). Reçoit, le 3 avril 1901, 5 c. c. de virus — signes et lésions classiques, sacrifié le 7e jour.

Fig. 3. — Animal mixte (Crimée-Anatolie), âgé d'un an (N° 74-136). Reçoit, le 6 mai 1901, 10 c. c. de bile, conservée 24 heures dans la glacière, — aucune réaction. — Reçoit le 15 mai 1901 5 c. c. de virus — fièvre seule.

Augmentation terminale. — Elle s'annonce habituellement le

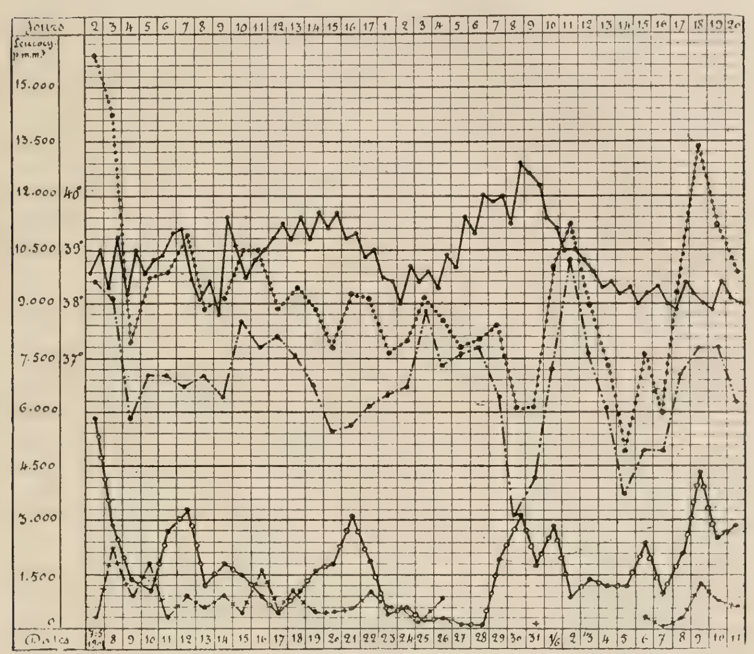


Fig. 4. — Animal mixte (Crimée-Anatolie), âgé d'un an (N° 74-159). Reçoit, le 6 mai 1901, 200 c. c. d'un sérum peu actif. — Reçoit, le 23 mai 1901, 5 c. c de virus — fièvre seule.

8e jour, quelquefois le 7e, exceptionnellement le 9e. A ce moment, le sujet infecté offre encore, d'ordinaire, de la fièvre (rarement la température est descendue la veille, ou descend le lendemain). En raison des approches de la mort, nous nous trouvions généralement obligé de sacrifier les animaux à cette période, pour récolter le virus. Dans les cas où, la mort n'étant pas imminente, nous laissions vivre les animaux, nous voyions les leucocytes continuer à augmenter de nombre. Ils dépassaient alors la normale (nous en avons compté, une fois, 45,000 par mm. c.) puis commençaient à redescendre lors de l'agonie.

Chiffre total des mononucléaires (et lymphocytes réunis). — Ils ne participent à l'augmentation initiale que dans la moitié des cas ; il en existe, parfois alors, jusqu'à 12,300 par mm. c. Après la phase, constante, de diminution (minimum observé : 1,000) se manifeste une augmentation progressive. Dans la moitié des cas, le chiffre reste cependant inférieur à la normale ; dans l'autre

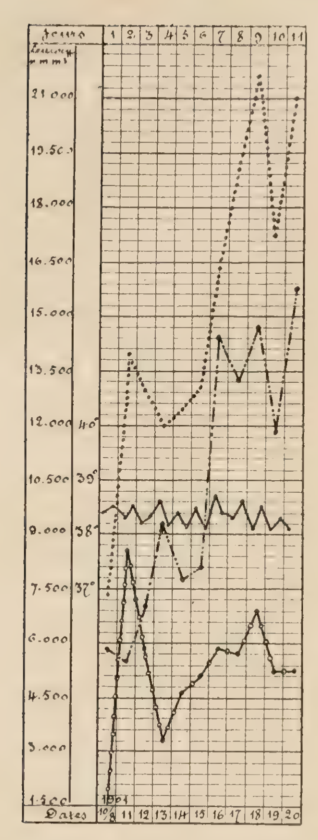


Fig. 5. — Animal mixte (Crimée-Anatolie) âgé d'un an. — Reçoit, le 10 août 1901, 5 c.c. de sérum et 2 de virus — aucune réaction.

moitié, il l'atteint et la dépasse même si la survie est suffisante (maximum observé : 27,000).

Chiffre total des polynucléaires. — Ils participent, le plus souvent, à l'augmentation initiale (maximum noté : 8,000). Après la diminution, constante (minimum noté : 200), ils augmentent de nombre. Dans la moitié des cas, il y a retour pur et simple à la normale ; dans l'autre moitié, on observe une polynucléose d'autant plus marquée que la vie se prolonge davantage (maximum noté : 18,000).

Chiffre total des éosinophiles. — Lorsqu'ils existent, on ne les voit pas augmenter constamment de nombre au début de la maladie. Quand cette augmentation se produit, le chiffre peut atteindre jusqu'à 3,500 par mm. c. Quoi qu'il en soit de ces modifications initiales, les éosinophiles ne tardent pas à diminuer (minimum observé : 200), puis ils disparaissent brusquement et ne se montrent plus jusqu'à la mort.

Remarque. — Le plus souvent, abstraction faite de la période d'augmentation initiale, les courbes des mononucléaires et des polynucléaires suivent une marche parallèle (exemple : la courbe n° 1). Le fait n'a cependant rien d'absolu, comme le démontre la courbe n° 2, dans laquelle la ligne des mononucléaires prend en écharpe celle des polynucléaires. De tels cas se rencontrent, de temps en temps, sans cause apparente.

MODIFICATIONS LEUCOCYTAIRES DANS L'INFECTION CURABLE

Chez l'animal 74-118, dont la courbe (n° 6) sera donnée en dernier lieu, il est facile de voir comment se sont présentées les variations des globules blancs.

Leucocytes en bloc. — On note d'abord les 3 phases classiques : augmentation initiale, diminution, augmentation secondaire. Puis, au moment de la chute de la fièvre, le chiffre vient à bais-

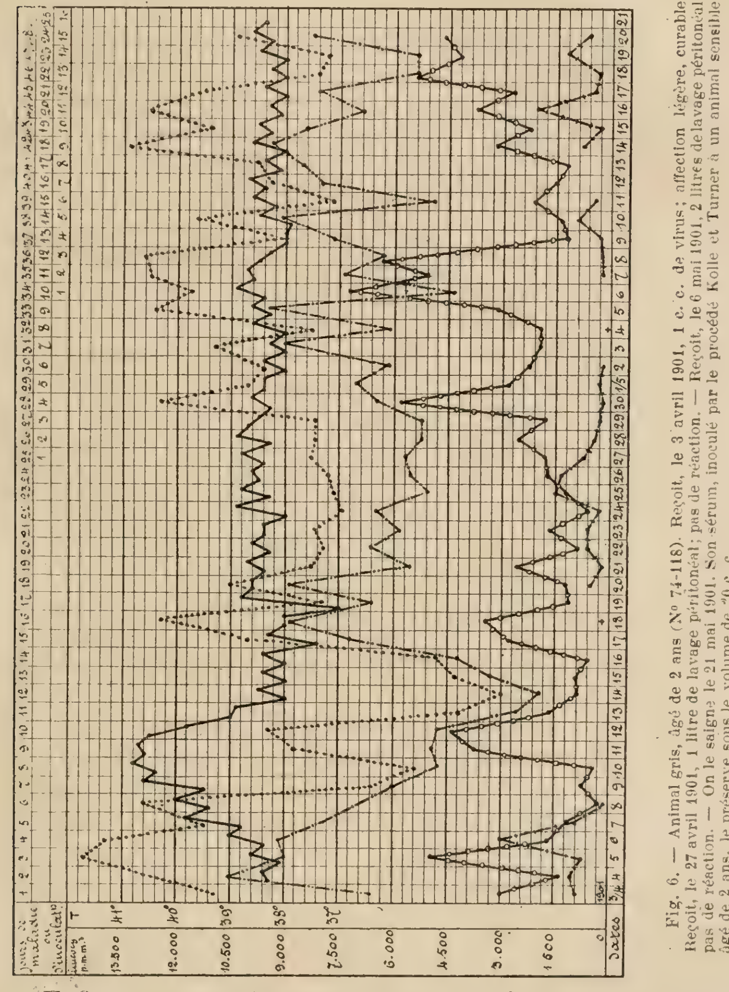


Fig. 6. — Animal gris, âgé de 2 ans (N° 74-118). Reçoit, le 3 avril 1901, 1 c. c. de virus ; affection légère, curable. Reçoit, le 27 avril 1901, 1 litre de lavage péritonéal ; pas de réaction. — Reçoit, le 6 mai 1901, 2 litres de lavage péritonéal, pas de réaction. — On le saigne le 21 mai 1901. Son sérum, inoculé par le procédé Kolle et Turner à un animal sensible, âgé de 2 ans, le préserve sous le volume de 20 c. c.

ser. Enfin, une *nouvelle augmentation* (maximum *le 16e jour*) est suivie d'un retour définitif à la normale.

Mononucléaires et polynucléaires. — Envisagées d'une façon générale, leurs courbes suivent une marche parallèle.

Eosinophiles. — Ils augmentent, diminuent et disparaissent. Puis, ils se montrent à nouveau le 16e jour.

MODIFICATIONS LEUCOCYTAIRES DANS LA VACCINATION PAR LA BILE

L'animal 74-136, dont nous reproduisons la courbe (n° 3), a montré, pendant l'action de la bile, un diminutif des oscillations leucocytaires qui caractérisent l'infection. Lors de l'épreuve, on a observé une courbe type d'infection, suivie d'une *poussée leucocytaire* offrant son maximum *le 17e jour*. Les éosinophiles ont reparu tardivement.

MODIFICATIONS LEUCOCYTAIRES DANS LA VACCINATION PAR LE SÉRUM

Sérum, puis virus. — Dans le cas rapporté ici (animal 74-159, courbe n° 4), on constate tout d'abord une hyperleucocytose passagère, consécutive à l'injection du sérum. Lors de l'épreuve, on voit les leucocytes pris en bloc et les mononucléaires diminuer, puis augmenter de nombre, tandis que les polynucléaires offrent des oscillations sans règle. A noter, encore ici, une *poussée leucocytaire tardive* (*le 18e jour*).

Sérum et virus en même temps (Méthode de Kolle et Turner). — On remarquera (courbe n° 5), coïncidant avec l'absence de toute réaction, même thermique, l'élévation en deux temps du nombre des globules blancs. La diminution relative, que l'on observe momentanément, correspond, sans nul doute, à la diminution absolue, qui caractérise les courbes d'infection. Nous avons dû, malheureusement, interrompre la numération le 11e jour. L'animal n'a pas cessé ultérieurement de se bien porter.

MODIFICATIONS LEUCOCYTAIRES DANS L'HYPERIMMUNISATION AVEC LE LIQUIDE DE LAVAGE PÉRITONÉAL

Il s'agit de l'animal 74-118, déjà étudié comme ayant résisté à l'infection expérimentale (courbe n° 6). Son observation ultérieure nous paraît fort instructive, en ce sens qu'elle démontre qu'un sujet peut fournir un sérum parfaitement actif, sans avoir réagi thermiquement. La production des anticorps, comme l'a prouvé M. Metchnikoff, n'est nullement liée, en effet, aux modifications de la température. Elle est, par contre, sous la dépendance intime d'une digestion intraleucocytaire, marchant habituellement de pair avec l'augmentation des globules blancs.

On notera, dans notre cas et contrastant avec l'absence de fièvre, une hyperleucocytose, qui se manifeste sous forme d'oscillations très-caractéristiques. On remarquera, également, que les éosinophiles disparaissent quelques jours après l'inoculation du virus, pour reparaître au bout de 48 à 72 heures.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

16me ANNÉE MARS 1902 N° 3

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LA TOXINE STREPTOCOCCIQUE,

Par le Dr Alexandre MARMOREK.

Malgré les perfectionnements apportés à la technique bactériologique, il a été jusqu'ici très difficile d'obtenir en dehors de l'organisme une sécrétion de toxine tant soit peu considérable chez la plupart des microbes qui se généralisent chez l'homme ou l'animal. En ce qui concerne le streptocoque, on a parfois réussi en utilisant des bactéries très virulentes; mais il s'agissait d'une exception, et la répétition de l'expérience échoue souvent pour le même microbe pathogène. Deux obstacles s'opposent chez les microbes dits « infectieux » à la production de toxine *in vitro* : la composition des milieux et les propriétés essentielles du microbe. La tâche devait donc être double : il fallait découvrir un milieu spécial et parvenir à stimuler les sécrétions du microbe.

Depuis longtemps, nous essayons d'atteindre ce double but avec le streptocoque. La découverte d'une méthode sûre de préparation de la toxine de ce microbe « infectieux » entre tous pourrait rendre de multiples services : non seulement le principe de la méthode pourrait s'étendre à d'autres microorganismes pathogènes, mais de plus la préparation d'un sérum antitoxique renforcerait singulièrement la vertu curative du sérum préparé par l'injection des corps microbiens.

L'arrêt que subit la multiplication du streptocoque dans son propre filtrat — phénomène que nous avons annoncé à la Société de Biologie[1] il y a plus de cinq ans — montrait une des causes de la pauvreté en toxine des cultures de notre microbe. Car dès qu'il cesse de se multiplier, et cela a lieu une demi-journée après l'ensemencement, il est évident qu'il suspend son

1. Séance du 26 novembre 1896.

activité et reste dans une vie latente, pendant laquelle sont arrêtées ses fonctions essentielles. Dès le début de ces recherches, nous sommes parvenu à remédier à cette particularité en ajoutant de l'extrait de bouillon à la culture, dans le but de déterminer de nouveau une multiplication des microbes.

Cette manœuvre, répétée à plusieurs reprises, finit par donner une quantité de toxine déjà assez considérable. Ce procédé, tout rudimentaire qu'il fût, nous montra la voie dans laquelle nos recherches devaient s'engager. Si d'un côté le microbe ne pousse plus quelques heures après l'ensemencement du milieu, et si d'autre part l'addition de substances nutritives suffit à refaire une culture en pleine activité, il est évident que nous devons chercher un milieu offrant en abondance ces mêmes substances, que l'activité du microbe épuise si rapidement. Nous nous sommes adressé dans ce but à toutes celles qui constituent un des termes de dégradation des matières albuminoïdes; et, après de longues expériences, nous nous sommes arrêté à la composition du milieu suivant, qui présentait tous les caractères voulus. C'est l'addition, au bouillon de viande peptonisé, d'une certaine quantité de leucine et de glycocolle. Nous ajoutons donc à 150 grammes de bouillon 0 gr. 40 de leucine. On chauffe à 60° et l'on fait passer à travers une bougie de porcelaine. On prépare ensuite la solution de glycocolle (0 gr. 50 dans 100 grammes de bouillon), on chauffe et on filtre. On ajoute de chacune de ces deux solutions 10 grammes à 250 grammes de bouillon peptonisé. Le streptocoque pousse parfaitement dans un tel milieu qui, d'ailleurs, reste trouble pendant de longues journées. Mais en outre le streptocoque, ensemencé dans le filtrat d'une telle culture, âgée de trois ou quatre jours, se multiplie très bien. Le liquide semble donc avoir les qualités nécessaires pour fournir une provision continue de toxine. En effet, la toxine ainsi obtenue est d'une activité constante.

Quant à l'autre question, celle de l'augmentation des facultés toxiques du microbe, elle restait à résoudre. L'idée qui nous guida dans nos recherches était l'observation suivante : le microbe paraît provoquer surtout des effets toxiques lorsque la résistance du malade est assez grande pour empêcher la généralisation immédiate du streptocoque. Au contraire, dans le cas d'une septicémie streptococcique, il ne faut pas oublier

que chaque unité de notre microbe doit produire infiniment moins de toxine, puisqu'il faut un nombre si considérable d'individus microbiens pour amener la mort.

De même que la conservation de la virulence du streptocoque exige un milieu spécial (bouillon-ascite), de même, pour transformer notre streptocoque en un microbe capable de donner une abondante provision de toxine, il faut apporter des modifications dans le milieu nutritif. Ce n'est plus le sérum d'un organisme sensible à l'infection streptococcique (homme, lapin) qui devra nous servir, mais au contraire celui d'un organisme très résistant, par exemple le cobaye, dont l'état réfractaire aura été encore renforcé par des injections de sérum antistreptococcique. Mais ce qui nous semble surtout avoir une influence considérable dans l'accroissement du pouvoir toxigène du microbe, c'est l'introduction d'autres agents dans le milieu nutritif. Ces agents sont des leucocytes polynucléaires retirés de l'organisme du cobaye immunisé. Voici donc notre procédé : on injecte à un cobaye déjà immunisé par deux ou trois fortes doses de sérum antistreptococcique, 10 c. c. de bouillon dans la cavité péritonéale. Le lendemain, on saigne l'animal afin d'obtenir son sérum, et on pratique le lavage du péritoine à l'aide d'eau physiologique. Les leucocytes qui s'y sont accumulés à la suite de l'injection de bouillon, une fois retirés avec les précautions aseptiques, sont immédiatement mélangés au sérum d'un autre cobaye, conservés à la température de 37° (sérum trois parties, eau une partie). Nous ne faisons pas subir de passage à travers l'animal au streptocoque destiné à la production de toxine, mais à partir de ce milieu spécial nous l'ensemençons en grande quantité dans un nouveau tube du même milieu, fraîchement préparé. Ce streptocoque sert à l'ensemencement du bouillon additionné de leucine et de glycocolle. On filtre cette culture après huit jours.

De nos recherches il résulte ceci : tous les streptocoques d'origine différente donnent la même toxine ; celle-ci fait partie du groupe de ces diastases qui sont détruites à la température de 70°. Le sérum préparé à l'aide de la toxine du même microbe (notre ancien streptocoque virulent) est actif contre les toxines de streptocoque d'autre origine. Enfin, nous ajouterons que ce procédé nous permet d'obtenir une toxine qui tue un lapin à la dose de 0,25 à 0 c. c. 50.

L'UNITÉ DES STREPTOCOQUES PATHOGÈNES POUR L'HOMME,

Par le Dr Alexandre MARMOREK.

Le grand rôle que joue le streptocoque en pathologie et les grandes différences que présentent quelques-uns de ses caractères morphologiques, ont attiré de bonne heure l'attention des bactériologistes; on s'est demandé notamment si toutes les formes en chaînettes rencontrées dans des maladies si diverses, soit à l'état isolé, soit associées à d'autres microbes, appartenaient à une seule et même espèce. Déjà, dans notre travail sur le streptocoque (Ces *Annales*, juillet 1895), parlant de la question des sous-espèces, nous avons refusé toute importance et toute valeur décisive aux caractères extérieurs du microbe, tels que grosseur des grains formant la chaînette, pouvoir de troubler le bouillon de culture, longueur des chapelets. Comme nous avons pu le démontrer dans ce mémoire, il suffit de déterminer une légère modification dans la composition du milieu (sérum-bouillon) pour voir s'effacer toutes ces distinctions, ou pour en faire naître d'autres. Il est vrai que le développement des colonies sous forme de petits points transparents sur milieu gélosé ne varie que dans des limites très étroites, il en est de même d'un autre caractère constant : la forme absolument ronde et régulière des grains. Celle-ci demeure invariable quel que soit le mode d'expérimentation ou quelle que soit la provenance du microbe. Puisque ces deux qualités sont communes à tous les streptocoques, elles deviennent insuffisantes pour établir entre eux de nouveaux groupements systématiques.

Il semblait à beaucoup d'auteurs qu'on eût trouvé dans le sérum antistreptococcique le moyen de dissiper tous les doutes. On pensait que le sérum obtenu par l'injection d'une espèce très virulente devait être en état de combattre l'infection causée par n'importe quel streptocoque, ceci dans l'hypothèse que tous les microbes en chaînettes formaient une seule et même famille ; par contre, l'inefficacité du sérum vis-à-vis d'autres formes streptococciques eût été la preuve de l'existence de plusieurs variétés. Très peu d'observateurs comprirent ce qu'avait d'inexact une telle conclusion. *A priori* il était très vraisem-

blable qu'un streptocoque exposé à vivre en symbiose avec d'autres bactéries, comme le bacille de Koch ou l'agent pathogène de la scarlatine, fût assez influencé par les nouveaux échanges chimiques pour y gagner d'autres propriétés.

Mais il y a des caractères communs à tous les membres d'une espèce bactérienne : ce sont ceux qui relèvent des fonctions primordiales de la vie, parmi lesquelles la fabrication de la toxine est au premier rang. Avant qu'on eût utilisé la toxine streptococcique pour l'immunisation des chevaux, il était impossible de se servir du sérum comme réactif des différents streptocoques. Depuis 1896, époque à laquelle M. Méry[1] recherchait l'influence du sérum antistreptococcique sur les streptocoques isolés de malades atteints de scarlatine, nous avons essayé d'accumuler le plus grand nombre de faits expérimentaux pour résoudre cette question si importante et si discutée. Nous n'attachons aucune importance à plusieurs signes assez vagues, tels que l'efficacité plus ou moins grande d'un sérum antibactérien sur l'animal infecté par un streptocoque donné, car la valeur de ce sérum dépend beaucoup de la manière et de la durée d'immunisation.

Dans cet ordre d'idées nous n'admettons que des propriétés bio-chimiques, communes à tous les streptocoques, quelle que soit leur origine.

Parmi ces qualités caractéristiques sans exception pour tous les échantillons de streptocoques pathogènes pour l'homme, trois surtout attirèrent notre attention. Nous avons examiné quarante-deux échantillons de provenance diverse. Dès maintenant nous pouvons dire que ces qualités dont nous parlions tout à l'heure, ajoutées aux autres demeurées constantes, nous permettent de définir la parenté entre un streptocoque isolé et tous les autres microbes en chaînettes formant la seule espèce de streptocoques pathogènes pour l'homme, et d'autre part nous autorisent à repousser comme non justifié tout nouveau groupement ou toute division entre ces microbes.

Deux caractères, que nous étudions déjà depuis plusieurs années, doivent être placés en première ligne : ce sont l'hémolyse du sang de lapins *in vivo*, et l'incapacité du streptocoque de pousser dans le filtrat de sa culture.

1. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, séance du 18 avril.

Dès le début de nos recherches sur l'exaltation de la virulence du streptocoque, nous avions constaté que le sang des lapins nous servant à faire nos passages se dissout dans l'organisme même et prend une couleur transparente et limpide de vin de Bourgogne. Cette propriété de dissoudre les globules rouges dans les vaisseaux même est non seulement une attribution du streptocoque, mais, — et cela augmente singulièrement la valeur de ce signe distinctif, — elle croît proportionnellement avec la virulence. Plus un streptocoque est virulent, plus vite et mieux il dissout le sang dans le corps de l'hôte. L'hémolyse *in vitro* peut présenter des différences légères toutefois suivant l'origine du microbe.

Nous avons eu à notre disposition et examiné des streptocoques de l'érysipèle, de la fièvre puerpérale, de l'angine scarlatineuse, de la pneumonie rubéolique, des pustules varioliques, du phlegmon, de la diphtérie, de la tuberculose, de l'influenza — et enfin, comme streptocoques de provenance équine, ceux de l'anasarque et de la gourme.

Dans le but d'exalter la virulence de nos microbes nous avons employé l'ancienne et classique méthode : passage par l'organisme du lapin avec ensemencement intermédiaire dans notre milieu de choix (bouillon-ascite), ou bien encore introduction de sacs de collodion dans la cavité péritonéale de lapins. Pour constater l'hémolyse en dehors de l'organisme, il suffit simplement d'ajouter au milieu de culture (bouillon peptonisé) un peu de sang défibriné, d'ensemencer avec le streptocoque et de porter à l'étuve. Au fur et à mesure que celui-ci se développe et secrète l'hémolysine, le dépôt de sang qui se trouve au fond, se dissout pour ainsi dire et change son opacité et sa couleur rouge foncé en une teinte transparente et rouge de vin. Si nous voulons comparer en même temps la différence du pouvoir hémolytique de deux ou plusieurs streptocoques, il est préférable d'ensemencer avec ceux-ci un tube ou une boîte de Petri, remplis de gélose, faiblement recouverte de sang défibriné. Après un séjour suffisant à l'étuve, il se forme autour de chaque colonie une élégante auréole d'hémoglobine dissoute dont les diamètres différents représentent la mesure du pouvoir dissolvant de chaque streptocoque.

Toutes ces méthodes donnèrent toujours le même résultat.

Tous les streptocoques d'origine humaine se comportèrent d'après les règles sus-mentionnées suivant leur virulence respective. Aussi bien l'agent de l'anasarque ne se distingue point par une différence marquée de tous les streptocoques humains. Un seul streptocoque avait toujours sa place à part. C'est celui qu'on retire de l'angine scarlatineuse. Evidemment il dissout (aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*) les hématies, mais son pouvoir hémolytique s'est montré toutefois de beaucoup inférieur à celui des autres microbes comparés. Même en augmentant sa virulence expérimentalement, l'hémolyse ainsi produite n'atteignit pas un degré très élevé, restant néanmoins évidente.

Donc, ce streptocoque partage avec les autres la qualité de secréter de l'hémolysine; on peut dire qu'il n'offre que des différences quantitatives et non qualitatives. Quant au microbe de la gourme, son pouvoir hémolytique atteint ordinairement celui du streptocoque qu'on trouve dans la scarlatine.

Qu'il nous soit permis, en passant, de constater que les perfectionnements apportés à la préparation du sérum antistreptococcique ont donné des résultats thérapeutiques meilleurs dans les complications à streptocoques de la scarlatine; mais, par contre, on ne saurait encore constater l'influence du même sérum sur la gourme comme cela a été prouvé depuis longtemps pour l'anasarque (Nocard-Lignières).

Quant au second signe, commun à tous les streptocoques, dont nous parlerons immédiatement, les deux streptocoques (celui de la scarlatine et celui de la gourme) tiennent une place à part, mais toujours de telle sorte que le streptocoque isolé de la scarlatine ressemble, malgré une petite différence, aux autres formes en chaînettes d'origine humaine, tandis que celui de la gourme ne participe guère à cette qualité commune.

Nous avons parlé de cette propriété dans une note communiquée à la Société de Biologie [1].

Nous y avons dit :

« Peu d'heures après l'ensemencement dans les milieux même les plus appropriés à sa vie, ce microbe cesse complètement de se multiplier; à partir de ce moment, les chaînettes commencent à tomber au fond et le liquide devient parfaitement

1. *Façon dont se comporte le streptocoque dans le liquide de culture où il a déjà poussé.* Séance du 26 novembre 1896.

clair. Si l'on filtre la culture et si, dans le liquide filtré, on ensemence une nouvelle trace de steptocoques, aucune multiplication n'aura lieu. Notons, cependant, que les microbes ensemencés y restent encore vivants 15 jours et plus. Si l'on veut qu'ils puissent se développer dans un semblable milieu, il est indispensable d'y ajouter une très petite quantité de milieu neuf (du bouillon ordinaire, par exemple, ou un peu d'extrait de bouillon). Pareillement, si l'on ajoute un faible volume de milieu neuf à une culture où tout développement s'est arrêté, on voit au bout de quelques heures le développement reprendre et le liquide se troubler à nouveau. »

Et nous continuions : « Le même fait a été constaté par nous pour d'autres microbes, tels que le pneumocoque, le microbe du choléra des poules... Le milieu dans lequel a vécu le streptocoque, et qui est devenu impropre à sa culture, permet cependant le développement des autres espèces microbiennes, telles que le staphylocoque, le pneumocoque, etc. *Il y a donc là une réaction spécifique du milieu de culture filtré vis-à-vis du streptocoque.* »

Nous nous servons dans ces expériences du dispositif suivant : On met dans un tube à essai 8 à 10 c. c. du filtrat streptococcique (des cultures de 24 à 48 heures sont déjà très convenables pour cette expérience) et on y ensemence une trace d'une culture riche. On agite et on met le tube à l'étuve à 37°. Or, malgré un séjour prolongé, on n'y constate aucun développement de streptocoques. Le filtrat reste limpide. Tous les streptocoques éprouvés par nous, excepté ceux de la scarlatine et de la gourme, se comportent d'une façon égale. Ils ne poussent ni dans leur propre filtrat ni dans celui d'un autre streptocoque. Des deux streptocoques ayant des propriétés particulières, celui de la scarlatine ne se développe que faiblement, l'autre toujours plus fortement. Nous pouvons donc nous représenter toute une gamme, depuis le filtrat laissé clair par les autres streptocoques, en passant par le trouble léger du streptocoque scarlatineux jusqu'au trouble plus louche du microbe de la gourme et finissant enfin par la culture la plus riche de toutes, celle d'un streptocoque poussant sur milieu ordinaire. Cette méthode ne nous a permis de relever aucune différence entre les divers streptocoques d'origine scarlatineuse que nous avons eus à notre disposition. De même, quelle que soit la provenance de la culture

streptococcique filtrée, l'ensemencement d'un échantillon de streptocoque scarlatineux nous a toujours présenté une culture aussi peu développée sur un filtrat que sur un autre.

Toutefois, il existe une gradation entre le trouble que donne le streptocoque de la scarlatine ensemencé sur un filtrat streptococcique et un pneumocoque développé dans un filtrat analogue. Ce dernier produit une opacité et une multiplication beaucoup plus riches.

A remarquer que le streptocoque de la gourme se rapproche presque, dans ces conditions, d'un microbe étranger se développant dans un tel filtrat.

Nous considérons comme troisième réaction bio-chimique l'action sur tous les streptocoques du sérum antitoxique retiré à des chevaux que nous immunisons depuis des années avec une toxine streptococcique, produite toujours par le même échantillon (notre ancien streptocoque virulent[1]).

Nous avons expérimenté avec ce sérum antitoxique l'immunisation de lapins contre tous les streptocoques. Les résultats étaient fort réguliers. Nous constations bien des différences dans la quantité à employer, mais nous réussissions toujours, avec de fortes doses, à prévenir la mort des animaux, même de ceux qui avaient reçu le streptocoque de la scarlatine. Les différences de sensibilité vis-à-vis du sérum qui s'y rencontrent (et que M. Méry a déjà signalées dans ses essais avec le sérum antibactérien) permettent peut-être de supposer que les streptocoques sont plus ou moins longtemps associés à l'agent pathogène de la scarlatine, et par conséquent inégalement impressionnés au cours de la symbiose.

Par contre, les essais faits avec le streptocoque de la gourme ne donnèrent pas de résultats concluants.

A tous ces caractères que revêt le streptocoque, il faut en ajouter un dernier, mais auquel nous n'attribuons qu'une valeur réduite : la faculté d'exalter à notre gré la virulence du streptocoque par une des méthodes mentionnées.

1. Nous avons divisé, dès le commencement de 1896, nos chevaux destinés à la préparation du sérum antistreptococcique en deux groupes. Les uns reçoivent les corps microbiens de streptocoques de toute provenance que nous pouvons nous procurer (et par conséquent des quarante-deux échantillons), tandis que l'autre série ne reçoit régulièrement que de la toxine. On délivre toujours un mélange du sérum des deux groupes de chevaux.

Cette qualité est commune à tous les streptocoques de n'importe quelle origine, — en admettant toutefois que cette exaltation dans la virulence soit plus marquée et plus rapide chez quelques-uns que chez d'autres.

Il reste une qualité que nous n'avons pas encore eu le temps de bien étudier, mais que nous réservons pour un travail ultérieur : la possibilité d'une démonstration éventuelle de la sensibilisatrice par la méthode Bordet-Gengou, et l'étude de cette substance au point de vue des différences qu'elle peut présenter chez les divers streptocoques.

Mais de longues recherches déjà entreprises nous ont prouvé que tous les streptocoques d'origine humaine, dans leurs fonctions bio-chimiques que nous venons de décrire, se comportent de la même façon. Même « la variété » qui semble si éloignée, le streptocoque de la scarlatine, présente seulement une divergence quantitative, mais ressemble essentiellement aux autres. Le streptocoque de la gourme se distingue trop, dans certaines propriétés fondamentales, des streptocoques d'origine humaine pour pouvoir se classer avec ceux-ci.

Nous croyons être autorisé à déclarer que, jusqu'à ce jour, aucune preuve scientifique n'a été apportée de l'hypothèse d'une diversité de races des streptocoques de l'homme. Au contraire, tout porte à croire que les cocci en chaînettes qu'on rencontre si souvent chez l'homme, appartiennent à une même famille. Si les streptocoques vivent longtemps associés à d'autres microbes pathogènes, on comprend aisément que cela leur imprime des signes extérieurs, qui de leur côté ne sont pas capables d'influencer leur composition intrinsèque, leurs fonctions physiologiques. Celles-ci restent les mêmes, tant que nous avons pu les étudier, et pour ces raisons nous persistons encore à admettre l'unité des streptocoques pathogènes pour l'homme.

SUR LE BLEUISSEMENT DE CERTAINS CHAMPIGNONS

DU GENRE « BOLETUS »

Par M. Gabriel BERTRAND.

Quand on casse ou qu'on froisse certains champignons appartenant au genre *Boletus*, on voit la chair mise à nu ou la partie lésée prendre rapidement une coloration d'un beau bleu. Cette coloration est très fugace et disparaît après quelques minutes. En France, on désigne communément ces champignons sous le nom de faux cèpes ou de faux bolets et, sans doute à cause de leur changement de couleur, on les considère comme vénéneux.

Plusieurs savants ont cherché, mais sans y parvenir d'une manière définitive, à donner l'explication de ce curieux phénomène.

Schönbein, en particulier, dans une lettre écrite à Faraday et publiée dans la *Philosophical Magazine*, en 1856 [1], a indiqué qu'on peut extraire de *Boletus luridus* Schaeff un principe résineux incolore, facilement soluble dans l'alcool et présentant avec la résine de gayac la plus étroite analogie : tous les réactifs qui bleuissent la solution alcoolique de résine de gayac agissent, en effet, de la même manière, sur la solution alcoolique de *Boletus luridus*. Comme, d'autre part, cette dernière solution se conserve à l'air sans se colorer, il faut bien admettre, toujours d'après Schönbein, qu'il y a dans le champignon une substance particulière capable de transformer l'oxygène de l'air en ozone. En fait, le jus de divers champignons colore en bleu la solution alcoolique de *Boletus luridus*.

J'ai montré par une série d'expériences publiées en collaboration avec M. Bourquelot [2] que les faits intéressants observés par Schönbein sont exacts; bien plus, que la laccase, extraite par moi de l'arbre à laque, existe aussi dans beaucoup de champignons et que c'est notamment à son intervention qu'il faut rapporter le bleuissement des bolets.

Après ces observations, il semblait qu'il n'y eût plus, pour connaître à fond le phénomène, qu'à savoir quel est le corps sur

1. Tome XI, 4e série, p. 137.
2. *Comptes rendus Soc. de Biologie*, 10e année, t. II, p. 579 et p. 582 (1895).

lequel se porte l'action de la laccase. On va voir dans la suite de ce travail que le bleuissement des bolets est en réalité un phénomène beaucoup plus complexe.

Quand on fait macérer dans l'alcool des fragments d'un bolet bleuissant quelconque, *Boletus cyanescens* Bull., *B. luridus* Schæff., *B. Satanas* Lenz, *B. pachypus* Fr., *B. Lupinus* Fr., etc., soit à froid, soit mieux encore à la température de l'ébullition, on obtient un liquide jaune. Celui-ci renferme le chromogène, puisqu'il bleuit à l'air par addition de laccase, mais on n'est pas certain que les substances organiques ou minérales qu'il contient en même temps ne jouent pas aussi un rôle dans l'apparition de la couleur bleue. Il fallait donc séparer le corps chromogène. Or l'expérience, plusieurs fois tentée, n'avait pas encore réussi.

Phipson, qui s'est occupé aussi du bleuissement des bolets, a bien prétendu que ces champignons renfermaient un principe incolore, analogue et peut-être même identique à l'aniline [1], mais Ludwig, et, avec lui, Gonnermann [2] ont prouvé que cette assertion était erronée. Pour eux, le chromogène des bolets bleuissants est un corps spécial, de nature azotée. Ils n'ont pas pu l'obtenir à l'état pur, mais ils ont reconnu qu'il ne présente ni les réactions de l'aniline ni, comme le croyait Rabenhorst [3], celle d'un composé de l'acide cyanhydrique.

Après une série d'essais, que la pénurie de champignons pendant plusieurs années a rendu fort longue, j'ai été assez heureux pour extraire enfin le chromogène des bolets bleuissants sous la forme cristallisée.

Je dirai tout de suite que ce chromogène, auquel je donne le nom de bolétol, est, non pas incolore, mais d'un rouge orange vif, comme l'alizarine. En solution concentrée, il présente la même couleur, mais si l'on dilue beaucoup, la solution devient peu à peu jaune d'or, puis jaune pur. C'est sous cette dernière couleur que le bolétol apparaît toujours dans les bolets qui en contiennent.

Aussi est-il curieux que les divers auteurs ayant étudié les bolets bleuissants aient prétendu que la chair de ces champignons était d'abord blanche.

1. *Comptes rendus Ac. d. Sc.* LI., p. 107 (1860) et *Journ. Soc. sc. méd. Brux.* 1860, et *Chemical News*, t. XXV, p. 301 (1872).
2. *Archiv. der Pharmacie*, 2e série, t. CXLIX, p. 107-117, 1872.
3. Cité par Ludwig.

Quand on casse un de ces champignons et qu'on observe le changement de couleur immédiatement, on voit, avec la plus grande netteté, le tissu passer du jaune au vert avant de devenir bleu. Un peu plus tard, la couleur bleue disparaît et, seulement alors, le tissu devient blanc ou grisâtre.

Le bolétol n'existe chez les champignons qu'en très petite quantité : 5 à 10 grammes au plus par 100 kilogrammes ; encore, cette petite quantité diminue-t-elle assez vite après la cueillette. Pour préparer le bolétol, je m'arrangeai donc de manière à revenir de mes excursions au laboratoire avant la fin de la journée. Les champignons étaient alors coupés en petits morceaux et ceux-ci jetés au fur et à mesure dans de l'alcool bouillant. Après un quart d'heure de chauffage, les réactions diastasiques étant arrêtées, je pouvais éteindre le feu et remettre la suite des opérations au lendemain.

La préparation du bolétol est un peu délicate. Elle repose sur quelques propriétés physiques assez particulières et voici comment on peut l'exécuter.

Les champignons, aussi frais que possible, sont divisés et mis à bouillir avec de l'alcool, comme il a été dit plus haut[1]. On prend 5 parties d'alcool à 95 0/0 pour 1 de champignons. L'ébullition est maintenue une demi-heure pour détruire les oxydases et dissoudre complètement le bolétol. Sans refroidir, on passe à travers une toile métallique fine ; on presse les morceaux de champignons et les liquides réunis sont précipités par l'acétate neutre de plomb. Après refroidissement, on complète la précipitation par quelques centimètres cubes d'acétate basique. Le précipité plombique jaune est recueilli, lavé, puis délayé dans une petite quantité d'eau froide, renfermant 10 0/0 d'acide chlorhydrique. Une partie du bolétol passe en dissolution avec d'autres corps organiques. Après filtration à la trompe, on peut l'extraire du liquide par agitation avec de l'éther. Dans les conditions où nous sommes placés, le bolétol est très soluble dans l'éther ; mais comme l'eau le retient énergiquement, il faut faire

1. Le bolétol n'existe pas seulement chez les bolets énumérés plus haut. On en trouve aussi chez d'autres espèces, par exemple : *Boletus subtomentosus* L., *B. chrysentheron* Bull., etc., dont la chair, d'un jaune pâle, peut être exposée à l'air sans devenir bleue. Ces champignons, très pauvres ou exempts de laccase, sont presque aussi bons pour l'extraction du bolétol.

Le latex de *Lactarius deliciosus* L. se comporte à l'air comme le suc des bolets bleuissants, mais je n'ai pu en traiter une quantité suffisante pour m'assurer qu'il renferme vraiment du bolétol.

plusieurs extractions. Chaque fois, l'éther décanté est filtré, puis distillé. Il reste un sirop rouge sang, qu'on abandonne dans une capsule à l'évaporation complète.

Le résidu, repris par l'eau froide, cède généralement à celle-ci tout son bolétol, tandis qu'il reste une certaine quantité de cristaux peu colorés et difficilement solubles, qu'on sépare par le filtre. La solution aqueuse de bolétol est de nouveau concentrée dans le vide à consistance de sirop. Quelquefois, en quelques jours, le bolétol cristallise. Sinon, on ajoute un peu d'acide chlorhydrique et, en 24 heures, le sirop se transforme en une bouillie grenue. On essore et on recristallise dans l'eau, par évaporation à sec. Quelques impuretés se séparent dans les zones extérieures qu'on met à part : on recueille la portion centrale, d'une couleur rouge vif, et on la purifie par de nouvelles cristallisations.

Cette méthode ne donne qu'une partie du bolétol. Pour obtenir le reste, il faut traiter le précipité plombique par l'éther. On dissout ainsi une assez forte proportion de matières grasses, qui retenaient le corps cherché en dissolution. Quand l'éther a été chassé par distillation, on épuise le résidu gras par l'eau chaude : le bolétol se dissout alors, dans un grand état de pureté. On filtre après refroidissement sur un filtre mouillé; on concentre dans le vide la solution aqueuse et on en retire le bolétol par agitation avec de l'éther.

Le produit obtenu dans cette dernière partie de la préparation est de beaucoup le plus facile à obtenir pur, à cause de l'action dissolvante, presque spécifique, des matières grasses. Aussi doit-on chercher à retenir, du moins momentanément, la plus grande quantité possible de bolétol à l'état de dissolution dans la graisse de champignons. On emploie donc assez d'alcool pour que le titre final du liquide d'extraction reste suffisamment élevé, et on traite ce liquide par le plomb quand il est encore chaud : le précipité entraîne alors la quantité maximale de matières grasses.

Le bolétol cristallise en fines aiguilles. A cet état, il est peu soluble dans l'eau froide, relativement peu soluble aussi dans l'éther et même l'alcool froids. Si on chauffe à l'ébullition, il se dissout au contraire en grande quantité dans tous ces liquides ;

1. G. Bertrand, Sur quelques propriétés de la dioxyacétone en relation avec l'état d'agrégation moléculaire. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXIX, p. 341, 1899.

mais, comme la dioxyacétone[1], il reste entièrement dissous lorsqu'on refroidit; il faut évaporer de nouveau à sec pour qu'il recristallise. Cette particularité laisse supposer que le bolétol existe aussi sous deux états d'agrégation moléculaire différents, dont le plus simple est seul très soluble. Les impuretés qui accompagnent le bolétol, et qui sont relativement abondantes quand les champignons sont traités trop tard après la récolte, retardent beaucoup l'agrégation des particules qui conduit à la forme cristalline. C'est à combattre leur effet que l'addition — empirique — d'un peu d'acide chlorhydrique au sirop de bolétol brut est destinée.

Le bolétol ne se dissout ni dans le chloroforme ni dans l'éther de pétrole, la benzine ou le sulfure de carbone. En solution dans l'eau, il absorbe les radiations lumineuses les plus réfrangibles, jusqu'à celles qui correspondent au vert; mais il ne donne pas de bande d'absorption dans le reste du spectre.

Je ne m'étendrai dans ce mémoire ni sur la composition ni sur les propriétés chimiques du bolétol; j'ai obtenu trop peu de matière cette année pour avoir la certitude nécessaire à cet égard. Pour le moment, il nous suffit d'ailleurs de savoir que ce corps, qui n'est pas azoté, présente tous les caractères d'un acide-phénol[1].

Ce qui frappe, tout d'abord, quand on traite une solution de bolétol dans l'eau distillée par la laccase, extraite de l'arbre à laque ou de divers champignons, c'est l'irrégularité et même la difficulté avec laquelle on obtient une coloration bleue. Mais bientôt, en variant les expériences et en notant les résultats avec soin, voici ce qu'on observe :

Quand on se sert d'une solution de laccase peu active, préparée par macération dans la glycérine, d'espèces médiocres de champignons, ou, ce qui est la même chose, d'une solution glycérinée un peu ancienne, on est obligé d'ajouter une quantité notable de solution de laccase. Alors, la coloration du bolétol devient toujours d'un beau bleu.

Si au contraire, on emploie une solution de laccase très active, tirée de l'arbre à laque ou, récemment, d'une bonne

1. Ce qu'on pouvait en partie prévoir d'après les relations qui existent entre la constitution des corps organiques et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase (G. Bertrand, *Bull. Soc. chim.* 3e série, t. XV, p. 791, 1896.)

espèce de Russule, il suffit d'une trace de liquide fermentaire pour faire virer la couleur du bolétol, mais alors la teinte obtenue n'est jamais d'un bleu franc : elle est verte, quelquefois même gris sale ou rougeâtre.

On est ainsi conduit à supposer qu'une substance particulière, accompagnant le bolétol (expériences anciennes) et la laccase (expériences nouvelles), intervient aussi dans la production du phénomène et, tout naturellement, il vient à l'esprit que cette substance pourrait bien être le manganèse.

L'expérience prouve que la première partie de la déduction est exacte, mais que la substance nouvelle est non pas du manganèse, mais un métal à peu près quelconque, alcalino-terreux, magnésien ou même alcalin.

Il suit de là que pour obtenir à coup sûr une belle coloration bleue, il faut prendre une solution aqueuse d'un bolétate, celui de potassium, par exemple. On peut encore arriver au même but, avec le bolétol pur, en ajoutant au mélange en réaction une trace de l'un des sels appartenant aux métaux énumérés cidessus.

A cause de la petite quantité de bolétol qui est nécessaire, la réaction est extrêmement sensible; elle décèle très bien les moindres souillures des vases de verre dans lesquels on l'exécute ou la présence des sels dans l'eau qu'on emploie.

La production de diverses couleurs trouve son explication dans ce fait que le composé quinonique dérivé du bolétol est luimême de couleur rougeâtre, tandis que ses combinaisons métalliques sont bleues. En acidifiant le liquide bleu, on met en liberté la bolétoquinone et la couleur vire immédiatement au rougeâtre.

D'après ces observations et mes recherches antérieures[1], le bleuissement des bolets exige donc le concours de six facteurs différents : l'oxygène et le bolétol ; la laccase, le manganèse, l'eau, qui agit à la fois comme dissolvant et comme agent nécessaire d'hydrolyse ; enfin, un métal alcalin, magnésien ou alcalino-terreux.

C'est un exemple remarquable de la complication que peuvent quelquefois présenter les réactions diastasiques et, d'une manière plus générale, les phénomènes biochimiques.

1. Sur le pouvoir oxydant des sels manganeux et sur la constitution chimique de la laccase (*Bull. Soc. chim.*, 3e série, t. XVII, p. 753, 1897).

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU PALUDISME ET DE SON HÉMATOZOAIRE
EN ALGÉRIE (CONSTANTINE)

Par le Dr A. BILLET

(Médecin-major de 1re classe, docteur ès sciences naturelles.)

(NOTE PRÉLIMINAIRE)

Les recherches que nous poursuivons depuis plus de deux ans, à Constantine, concernant le paludisme et son hématozoaire, nous conduisent, dès aujourd'hui, d'après un total de 395 observations[1], à formuler les principales règles fondamentales du développement de ce parasite, suivant les différentes formes de l'infection palustre qu'il détermine.

Il existe, en Algérie, ainsi que l'ont observé presque tous les médecins depuis la conquête, deux saisons météorologiques bien distinctes pendant lesquelles le paludisme affecte des allures différentes, en même temps que le parasite, lui aussi, présente deux séries de formes bien tranchées :

1° *La saison estivo-automnale*, que M. Laveran, le premier, a nettement délimitée et qui s'étend de la fin du mois de juin à la fin du mois de novembre. Cette saison s'annonce, au mois de

1. Chacune de ces observations, recueillies dans notre service de l'hôpital militaire de Constantine, comprend non seulement l'examen clinique de chaque malade avec tous les renseignements relatifs à l'étiologie, au mode fébrile et à la nature des principaux symptômes notés dans le cours de l'affection, mais encore un feuillet hématologique où, à côté du nombre et de la forme des parasites rencontrés, on a dressé la formule hémo-leucocytaire correspondante.

Dans une note récente (*Soc. de Biologie*, 7 déc. 1901), après avoir établi la présence constante de l'hématozoaire dans tous les cas de paludisme que nous avons eu à traiter, nous avons énuméré les différentes formes sous lesquelles nous l'avons rencontré, soit :

1° Formes amiboïdes grandes, pigmentées, aboutissant au mode de multiplication endogène par *rosaces*..	193 fois.
2° Formes amiboïdes, petites, peu ou pas pigmentées, seules..	44 —
3° Formes amiboïdes petites et *croissants*............	152 —
4° *Croissants* seuls..	6 —
Total..............	395 fois.

juin, par de violents orages, suivis de fortes chaleurs; le vent du sud ou *siroco* domine; et bientôt survient une sécheresse presque ininterrompue pendant les mois de juillet, août et septembre. La température maxima moyenne oscille alors entre 30° et 35°. En octobre, puis en novembre, des pluies abondantes, souvent même torrentielles, apparaissent, qui abaissent peu à peu la moyenne de la température à 8° ou 10°.

Pendant cette période, à côté des rechutes graves chez d'anciens impaludés, on voit éclore les premières atteintes de paludisme chez les individus nouvellement arrivés dans la colonie et qui ont passé l'hiver et le printemps sans être contaminés.

Le médecin militaire est mieux placé que tout autre pour étudier ce fait d'observation générale sur le contingent venu de France afin d'accomplir ses trois années de service, et qu'il peut suivre journellement, pour ainsi dire, en notant chez le même sujet l'époque exacte de la première atteinte, la fréquence et la nature des rechutes subséquentes, et finalement leur disparition définitive ou temporaire par le traitement spécifique.

On est ainsi amené à poser comme axiome fondamental l'aphorisme suivant :

On ne contracte pas le paludisme en Algérie, sur le littoral du moins, avant les derniers jours du mois de juin, et cela même dans les localités les plus notoirement insalubres[1].

Le paludisme qui atteint, pour la première fois, les nouveaux arrivés en Algérie est très souvent irrégulier (au sens le plus large du mot) et dans ses manifestations cliniques et dans les modalités de son type fébrile.

Au lieu de présenter, comme dans les accès francs, la succession des trois stades connus de frissons, de chaleur, de sueurs, il affecte fréquemment des formes frustes et anormales. Un des termes du syndrome classique précédent, quelquefois même plusieurs à la fois, peuvent manquer et les symptômes d'infection profonde, à allures parfois manifestement typhoïdes, dominent la scène.

1. La fin du mois de juin est également la date que presque tous les auteurs s'accordent à assigner à l'apparition du paludisme de première invasion dans le bassin méditerranéen, et en particulier dans les trois péninsules : ibérique, italique et hellénique. Nous avons montré (*Acad. des Sciences*, 2 sept. 1901) qu'en Algérie cette date coïncidait précisément avec l'éclosion et l'apparition, dans les régions palustres, de certaines espèces de culicides, en particulier du genre *Anopheles* dont le rôle actif dans la propagation du paludisme a été surabondamment démontré partout où règne l'endémie palustre.

Il en résulte que ce paludisme, dit de première invasion, aboutit fréquemment, et pour ainsi dire d'emblée, soit à la cachexie palustre, soit à la perniciosité avec ses formes infiniment variées.

Nous désignons cette première manifestation du paludisme sous le terme de *paludisme primaire* pour indiquer que c'est le *premier échelon* de l'infection palustre aiguë, et pour l'opposer au second échelon de cette même infection, ou *paludisme secondaire*, que nous décrirons plus loin.

Le terme de paludisme primaire a en outre le mérite de ne rien préjuger des manifestions cliniques à la fois si variées et si inconstantes qu'on y observe et dont la nomenclature n'a pas peu contribué à obscurcir la conception que l'on doit se faire actuellement du paludisme. Il sert au contraire à réunir ces multiples désignations en un seul faisceau compact, car elles relèvent toutes d'une seule et même cause pathogénique.

Si, en effet, le paludisme primaire est éminemment capricieux dans son évolution clinique, le parasite qui le détermine est au contraire, dans la majorité des cas, toujours identique à lui-même.

Il se présente constamment, pendant toute la durée de la période fébrile, aussi bien dans le cours des premiers accès que dans le cours des nombreuses rechutes de la saison estivo-automnale, sous une forme invariable. Cette forme du parasite est la forme endoglobulaire petite, ne dépassant guère 1 à 3 μ de diamètre, arrondie-ovalaire, peu ou pas amiboïde, constituée par une zone extérieure et annulaire de *cytoplasma* excessivement mince, ne présentant que rarement quelques grains isolés de *mélanine*, et entourant un noyau vacuolaire, central, relativement volumineux, muni lui-même d'un grain de chromatine excentrique ou *karyosome*.

Ce parasite correspond exactement à la forme la plus petite de l'hématozoaire décrit par M. Laveran (*Hæmamœba malariæ*, var. *parva*, Laveran.)

C'est le parasite de la fièvre estivo-automnale des auteurs italiens, identique lui-même au parasite de la fièvre tropicale des auteurs allemands et anglais (*Hæmamœba* ou *Plasmodium præcox*, Grassi et Feletti, *Hæmomenas præcox*, Ross).

Dans la majorité des cas, cette petite forme, surtout dans les

rechutes du mois de septembre et octobre, aboutit invariablement à la forme dite en *croissant*.

Or, il est prouvé aujourd'hui que les *croissants* sont analogues aux *macrogamètes* et *microgamètes* du cycle évolutif d'autres *Sporozoaires*. Ils représentent un des stades de la reproduction *sexuée* du parasite, dont l'évolution ultérieure et complète (*sporogonie*) s'achève dans le corps de certains diptères suceurs de la famille des Culicidés.

Nous avons rencontré ces deux formes caractéristiques dans 202 cas de paludisme primaire. Elles se répartissent de la façon suivante :

Formes amiboïdes petites seules........................	44 fois.
— — — et croissants consécutifs...	152 —
— en croissant seules........................	6 —
Total.....................	202 fois.

Au point de vue de la répartition mensuelle, on trouve :

	Juillet	Août.	Septembre.	Octobre.	Novembre et décembre.	TOTAL
Formes amiboïdes petites seules...	1	5	23	11	4	44
— — et croissants consécutifs....................	6	21	41	63	21	152
Croissants seuls..................	»	»	»	1	5	6
Total général..........................						202

Autrement dit, c'est surtout en septembre que les formes amiboïdes petites se rencontrent seules, et en octobre que leur association avec les croissants est la plus fréquente.

En général, c'est pendant la période fébrile que l'on trouve la petite forme amiboïde, tandis que les croissants n'apparaissent qu'au bout de quelques jours d'apyrexie et persistent pendant toute la durée de celle-ci jusque dans les derniers jours de la saison estivo-automnale, et cela malgré le traitement quinique qui semble n'avoir aucune action sur eux.

Au point de vue de l'abondance des parasites, c'est pendant

les mois d'août et de septembre que les petites formes amiboïdes présentent leur maximum de développement. Il n'est pas rare alors de noter jusqu'à 5, 6, 10 globules parasités, parfois même davantage par champ du microscope. Un certain nombre de globules peuvent même renfermer 2, 3 et 4 parasites à la fois, dérivés l'un de l'autre par simple bipartition.

En octobre, au contraire, les croissants abondent. On peut en compter 2, 3 et quelque fois 5 et 6 par champ du microscope.

Puis, peu à peu, ces derniers deviennent de plus en plus rares, pour diminuer notablement de fréquence dans les derniers jours de novembre et finalement disparaître complètement à la fin de décembre ou au commencement de janvier.

Dès lors, les croissants ne réapparaissent plus dans le cours de l'infection palustre et chez le même individu, quel que soit le nombre des rechutes subséquentes.

Ceci nous amène à formuler cette autre proposition :

Le paludisme primaire ne dure qu'une saison estivo-automnale, du mois de juin au mois de décembre.

Cette loi s'est présentée à notre observation avec une régularité et une constance telles que, inversement, lorsqu'un individu autrefois impaludé, mais qui n'a pas eu de rechute de paludisme depuis plusieurs années, a de nouveaux accès fébriles avec petits corps amiboïdes et corps en croissants, on peut affirmer à coup sûr qu'il y a chez lui *ré-infection*, c'est-à-dire *récidive.*

Nous avons constaté le fait chez 13 sujets algériens et chez 22 indigènes qui n'avaient pas eu depuis longtemps d'attaque de paludisme, et qui se présentaient à notre examen atteints de nouveaux accès intermittents avec les parasites du paludisme primaire ;

2° *La saison hiberno-vernale* s'étend de la fin du mois de novembre ou du commencement de décembre à la fin du mois de juin de l'année suivante. Pendant cette période, la pluie ne tombe plus que par intervalles plus ou moins espacés ; les vents du nord et du nord-ouest sont les vents dominants et amènent, dès le mois de décembre, un froid de plus en plus vif. Puis, peu à peu, le printemps et les belles journées réapparaissent avec une température moyenne de 10° à 12°.

Le paludisme, quoique moins accentué que dans la période

précédente, se manifeste néanmoins pendant la saison hiberno-vernale. Mais, ainsi que nous l'avons déjà dit, on ne signale jamais, pendant cette période, de cas nouveaux de paludisme primaire.

On n'y observe uniquement, et sans aucune exception, que des rechutes de paludisme, et cela aussi bien chez les sujets déjà impaludés depuis plusieurs années que chez les paludéens dont l'infection ne remonte qu'à la saison estivo-automnale précédente.

M. Laveran [1] a, depuis longtemps, insisté sur ce fait d'observation générale, dont l'importance n'échappera à personne.

Nous désignons cette seconde manifestation du paludisme sous le nom de *Paludisme secondaire*, par opposition au paludisme primaire, dont il diffère à la fois par ses caractères cliniques et par la forme du parasite qu'on y trouve.

Nous préférons cette dénomination à celle de « Paludisme de deuxième invasion », qui peut prêter à confusion. Nous réservons d'autre part le terme de *Paludisme chronique* au paludisme invétéré, caractérisé par les altérations profondes de l'organisme et en particulier des organes hématopoiétiques.

Au point de vue clinique, on y observe, pour la première fois, d'une façon constante, les types fébriles nettement définis des accès intermittents : type quotidien, type tierce et type quarte. Les types irréguliers, ainsi que le type sub-continu n'existent que fort rarement. En même temps, les accès se présentent avec la triade symptomatique classique (stades de frissons, de chaleur et de sueurs) qui caractérise les fièvres intermittentes dites *parfaites* par certains auteurs.

Quant au parasite, il est *exclusivement* représenté par les grandes formes amiboïdes endoglobulaires fortement pigmentées de mélanine, dont le type adulte, sphérique, volumineux, envahit tout le globule et atteint son développement complet en 48 heures (dans les accès tierces) ou en 72 heures (dans les accès quartes).

De même que la forme amiboïde petite aboutit presque invariablement au *croissant*, et constitue le premier terme du mode de reproduction sexuée du parasite, la forme amiboïde grande et pigmentée aboutit fatalement à la *rosace*, c'est-à-dire au mode

1. *Traité du Paludisme*, 1898, p. 23.

de multiplication endogène par *schizogonie*. Les nombreux segments, ou *mérozoïtes*, qui en résultent se répandent dans le sérum et envahissent de nouveaux globules renouvelant incessamment la maladie *par auto-infection*, et donnant ainsi le signal d'un nombre indéfini de rechutes.

Ce parasite correspond exactement, suivant la forme des rosaces et la nature tierce ou quarte des accès qu'il détermine, tantôt à la variété *tertianæ*, tantôt à la variété *quartanæ* de l'*Hæmamæba malariæ* de M. Laveran.

Un grand nombre d'auteurs ont fait de ces deux sortes de formes deux espèces distinctes : *Hæmamæba = Plasmodium vivax* (parasite de la tierce) Grassi et Feletti, et *Hæmamæba = Plasmodium malariæ* (parasite de la quarte) Grassi et Feletti.

Nous trouvons, parmi nos observations, 53 cas de paludisme secondaire survenus pendant les deux saisons hiberno-vernales de 1900 et de 1901. A ces cas, on doit ajouter les rechutes constatées dans les périodes estivo-automnales de 1899, de 1900 et de 1901, chez d'anciens paludéens, et dont le nombre s'élève à 138. Chez ces derniers en effet, malgré la différence des saisons, on n'observe que les formes amiboïdes, grandes, pigmentées, à multiplication endogène.

Le paludisme secondaire, quelle que soit la saison pendant laquelle il se manifeste, est donc essentiellement caractérisé par la présence des formes parasitaires amiboïdes, grandes et pigmentées, aboutissant au mode de multiplication par voie endogène ou asexuée.

Des considérations précédentes, il résulte que :

1° Si le paludisme présente des modalités et des manifestations cliniques très diverses, suivant la saison où il se déclare et surtout suivant le degré de réceptivité de l'individu qu'il contamine, il n'en constitue pas moins une entité morbide bien définie caractérisée par des lésions anatomo-pathologiques toujours identiques et un parasite endoglobulaire également unique ;

2° Le parasite parcourt dans son développement un double cycle évolutif :

A. — *Cycle estivo-automnal*, de première invasion ou du paludisme primaire, qui n'évolue que chez les sujets jusqu'alors indemnes d'infection palustre. Ce cycle est représenté par la forme amiboïde petite de l'hématozoaire et aboutit, dans le majorité des cas, au *croissant*, première phase du

mode le plus fréquent de reproduction sexuée de ce parasite[1];

B. — *Cycle hiberno-vernal*, ou du paludisme secondaire, c'est-à-dire du paludisme que l'on rencontre chez les sujets ayant précédemment subi une première atteinte.

Ce cycle est représenté par la forme amiboïde grande et pigmentée du *même* hématozoaire, et aboutit à la *rosace*, stade ultime du mode de multiplication par voie endogène ou asexuée de ce parasite.

Aux nombreuses preuves que nous venons de donner de l'unité dans le mode de développement du parasite et de son double cycle évolutif, il convient d'ajouter que, dans 20 cas différents, nous avons pu assister directement à l'évolution du paludisme primaire en paludisme secondaire, autrement dit au passage des formes petites accompagnées de croissants aux formes amiboïdes grandes et pigmentées.

Ces observations concernent des individus chez lesquels nous avons pu surprendre cette transformation pendant leur séjour à l'hôpital et principalement pendant les premiers mois d'hiver, ou bien des paludéens qui, ayant contracté leur première atteinte (paludisme primaire) pendant une saison estivo-automnale donnée, revenaient se faire soigner, dans le cours de la saison hiberno-vernale suivante, atteints de paludisme secondaire.

Dans ce dernier cas, on ne saurait objecter que ces malades aient subi une nouvelle infection; puisque nous avons démontré et posé en principe le fait suivant, à savoir qu'on ne contracte

1. Nous disons, à dessein, que le *croissant* représente la première phase du mode le plus fréquent (nous devrions ajouter le plus caractéristique) de la reproduction sexuée de l'hématozoaire du paludisme.

En effet, un certain nombre d'auteurs, entre autres Bignami et Bastianelli, ont décrit, dans le cycle évolutif du parasite de la tierce, d'autres formes sexuées endoglobulaires, représentant des macrogamètes et des microgamètes. Ces formes sexuées sont régulièrement arrondies et d'un tiers plus petites que les formes de segmentation (*Annali di igiene sperim.*, IX, 1899).

Cette distinction morphologique, entre la forme générale des gamètes, les uns de forme arrondie, les autres en forme de croissant, est un des principaux arguments des auteurs précités en faveur de la séparation spécifique du parasite de la tierce proprement dite, et celui de la fièvre estivo-automnale.

Or, tout récemment, J. Ewing (*New-York med. Journ.* July 27, 1901) a observé chez les paludéens revenant de Cuba, et chez lesquels l'infection était intense, la présence de *formes de conjugaison*, entre deux hématozoaires de la tierce, inclus dans un même globule. Il a étudié la fusion de leurs *cytoplasmes* et de leurs *karyosomes*, en un seul corps protoplasmique arrondi, à noyau unique, qui plus tard devenait soit un macrogamète, soit un microgamète. Ces corps sexués ne diffèrent en rien de ceux décrits par Bignami et Bastianelli.

D'après ces observations précises de J. Ewing, il semblerait donc prouvé qu'à côté des formes sexuées d'emblée, qui caractérisent ce que nous avons appelé le paludisme primaire, il existe des formes également sexuées, particulières au paludisme secondaire et produites par conjugaison.

pas le paludisme en Algérie pendant la saison hiberno-vernale. Par conséquent, le paludisme dont ces malades présentaient les manifestations secondaires pendant une saison hiberno-vernale donnée était bien la succession du même paludisme contracté pendant la période estivo-automnale précédente.

Les idées que nous venons d'exposer et qui, nous le répétons, ne sont que l'interprétation exacte des faits que nous avons observés pendant plus de deux années, confirment celles que M. Laveran a constamment défendues, depuis le jour où il a fait la mémorable découverte de l'hématozoaire du paludisme.

Elles corroborent également les recherches précises effectuées au Sénégal par Marchoux, en Italie par Antolisei, et, en partie du moins, à Cuba, par J. Ewing.

Elles concordent enfin avec ce que nous connaissons jusqu'à ce jour de la biologie, non seulement des *hæmocytozoa* ou *hémosporidies*, mais encore de la plupart des sporozoaires.

Mais si l'étude du paludisme en Algérie ne nous autorise pas à admettre l'autonomie spécifique du parasite, dit de la fièvre estivo-automnale ou tropicale, nous inclinons fortement à penser qu'il existe une distinction fondamentale entre les deux espèces de formes amiboïdes grandes et pigmentées, qui caractérisent d'une part les accès francs de fièvre tierce, et d'autre part ceux de fièvre quarte de notre paludisme secondaire.

Nous ne possédons que 11 observations de fièvre quarte bien confirmée. Mais chaque fois, soit au début, soit pendant le cours des nombreuses rechutes qu'ont présentées les sujets atteints de ce type tenace de fièvre intermittente, nous avons pu nous convaincre des différences essentielles qui existent entre les formes à multiplication endogène de la tierce et les formes correspondantes de la quarte.

Les principales de ces différences, formulées par Golgi dès 1891, sont les suivantes : 1° formes amiboïdes moins volumineuses dans le parasite de la quarte, à noyau moins visible, en raison de l'abondance du pigment mélanique, dont les grains sont également plus gros et plus noirs, à contours moins irréguliers, et surtout à *rosaces* généralement segmentées en 8 mérozoïtes, au lieu de 16 à 20 dans les rosaces de la tierce, qui sont elles-mêmes beaucoup plus volumineuses ; 2° déformation et hypertrophie très accentuées des globules parasités dans la

tierce; tandis que dans la quarte, les globules parasités conservent leur forme et leurs dimensions presque intactes, et souvent même sont plutôt rétractés; 3° enfin, apparition dans les globules parasités de l'altération granuleuse particulière de l'hémoglobine, décrite pour la première fois par Schüffner[1], et en second lieu par Maurer[2], altération très appréciable dans la tierce, tandis qu'elle est nulle ou à peine sensible dans la quarte.

Conclusions. — En définitive, la conception du paludisme telle que nous le comprenons d'après l'ensemble des faits que nous avons observés est la suivante : Il existe, en Algérie, deux formes de paludisme correspondant à deux espèces de parasites bien distinctes : le paludisme de la fièvre tierce et le paludisme de la fièvre quarte, ce dernier étant beaucoup plus rare que le premier (2,7 0/0 à Constantine).

Chacune de ces formes de paludisme présente un double cycle clinique et parasitaire à savoir : 1° cycle estivo-automnal. à manifestations primaires survenant chez les sujets non encore impaludés, à type fébrile souvent mal délimité, et dont le parasite est représenté par la forme amiboïde petite et croissants consécutifs (cycle parasitaire de reproduction sexuée) ; 2° cycle hiberno-vernal, à manifestations secondaires, chez les sujets déjà impaludés depuis une ou plusieurs années, à type nettement tierce ou nettement quarte, et dont le parasite est représenté par la forme amiboïde grande fortement pigmentée et rosaces consécutives (cycle parasitaire de multiplication endogène ou asexuée[3]).

1. *Deutsch. Archiv. f. klin. Med.*, t. LXIV. Cette altération toute spéciale, qui, pour nous, est intimement liée à la production de mélanine, ne se décèle que par le mélange d'éosine et de bleu de méthylène, suivant les méthodes de Romanowsky et de M. Laveran, ou autres procédés qui en dérivent.

2. *Centralbl. f. Bakter.*, XXVIII, n°s 4 et 5.

3. Cette conception de paludisme se trouve déjà entièrement démontrée en ce qui concerne le parasite de la tierce. Quant au parasite de la quarte, la vérification semble plus difficile, en raison même de la rareté de cette forme de paludisme en Algérie, sur le littoral du moins. Toutefois, sur les onze cas de fièvre quarte dont nous avons déjà parlé, nous avons pu, à deux reprises différentes, suivre pas à pas la transformation des formes amiboïdes petites, avec leurs croissants, en formes amiboïdes grandes et pigmentées, à multiplication asexuée. Il nous a semblé, en particulier, que les formes amiboïdes petites du paludisme primaire de type quarte étaient plus volumineuses que celles correspondantes du paludisme primaire de la tierce. Enfin et surtout, les croissants nous ont paru manifestement plus gros, plus trapus, à extrémités moins effilées, plus arrondies, et à grains de pigment mélanique plus noirs, plus confluents et plus volumineux que ceux des croissants de la tierce.

RECHERCHES
SUR LES MODES D'UTILISATION DES ALIMENTS TERNAIRES
PAR LES VÉGÉTAUX ET PAR LES MICROBES

PAR P. MAZÉ

(Chef de laboratoire de l'Institut Pasteur).

PREMIER MÉMOIRE

Les hydrates de carbone alimentaires soumis à l'action des sucs digestifs se dédoublent peu à peu, par voie d'hydrolyse, pour aboutir aux hexoses, et c'est à cet état qu'ils sont considérés comme directement assimilables.

Si l'on veut puiser dans la littérature quelques renseignements sur les transformations ultérieures que la cellule leur fait subir, on s'aperçoit tout de suite que l'on sait peu de choses sur ce côté de la question. Je me propose d'exposer dans ce travail les recherches que j'ai faites pour tenter de faire un pas dans cette voie.

On admet généralement que chez les animaux supérieurs, les sucres semblent constituer exclusivement une source d'énergie et de chaleur ; ce ne sont pas des substances destinées à contribuer à la formation de la matière vivante; c'est un combustible que la cellule brûle, pour développer de la force ou pour entretenir la température.

Si l'on descend l'échelle des êtres vivants et si l'on considère les organismes les plus simples comme les microbes, cette conception ne correspond plus à la réalité des faits. Beaucoup de microbes, et les moisissures plus spécialement, sont capables d'édifier leurs matières protéiques aux dépens du carbone du sucre, avec l'ammoniaque comme source d'azote; mais la cellule adulte semble, du moins en apparence, agir comme la cellule animale vis-à-vis du sucre; tout se passe comme si celui-ci subissait la combustion totale; on ne trouve généralement, comme produits ultimes des transformations dont il est le siège,

que l'acide carbonique et l'eau, lorsque l'alimentation est convenable et qu'il n'y a jamais pénurie d'oxygène.

Les levures et les moisissures sont des agents de combustion très actifs lorsqu'ils se développent à la surface des milieux de culture, en large contact avec l'air; mais en même temps que la fraction la plus importante du sucre se résout en eau et acide carbonique, l'autre portion, qui est loin d'être négligeable, se retrouve à l'état de substances vivantes, qui, pour la plupart, ne présentent plus aucune parenté de constitution avec les sucres et l'ammoniaque qui ont servi à les former. Peut-on déterminer quel est le fragment de la molécule sucrée qui entre définitivement dans la constitution des matières protéiques? Voilà ce qu'il faudrait montrer. Mais auparavant, il s'agit d'orienter les recherches.

Lorsqu'on ménage l'accès de l'air à des cultures de levures ou de moisissures, ou qu'on les en prive complètement, on sait qu'on assiste à des phénomènes différents de ceux que je viens de résumer. Les levures font disparaître rapidement le sucre; on en trouve à peu près la moitié à l'état d'alcool, l'autre s'étant volatilisée à l'état d'acide carbonique; mais par contre, l'augmentation de poids de cellules vivantes est faible, ou nulle, ou négative, suivant les conditions de l'expérience. Les moisissures se comportent à peu près de la même façon; le sucre disparaît à l'état d'alcool et d'acide carbonique, mais très lentement; l'accroissement du poids de mycélium est également très faible ou nul.

Dans le premier cas, celui des cultures aérées, la cellule vivante, qui s'est multipliée dans des proportions énormes, vit comme un végétal ordinaire pris pendant la période germinative; elle a mené une vie végétative; dans le second, elle a agi comme un ferment.

Ces deux existences nous apparaissent comme tout à fait distinctes, et on est d'autant plus fondé à les séparer que les produits de transformation du sucre se présentent comme des substances nuisibles vis-à-vis de la cellule ferment qui les a formés. En l'absence d'oxygène, ses fonctions protoplasmiques ont été complètement déviées ou profondément altérées; la vie végétative est une vie normale, physiologique; l'organisme ferment est un être malade puisqu'il donne naissance, en apparence, à des produits pathologiques.

La découverte de la zymase par M. Buchner se présente comme étant susceptible d'enlever à cette conception un peu de son assurance; mais elle ne suffit pas à l'ébranler complètement, parce que cette diastase ne semble apparaître que lorsque le végétal est privé d'oxygène ; la levure végétative n'en renferme pas. Cependant, lorsqu'on place un végétal entier dans une atmosphère débarrassée d'oxygène, on peut constater immédiatement la formation d'alcool dans ses tissus. M. Berthelot[1] insiste, avec raison, sur la nécessité de tuer immédiatement par la vapeur d'eau les feuilles ou les parties de végétaux chez lesquelles on recherche de petites quantités d'alcool, parce que si l'on attend quelques instants, on risque de ne trouver que de l'alcool formé après l'ablation des organes, surtout si on les soumet vivants au broyage; cela veut dire que la zymase, ou une diastase analogue, existe même dans les tissus végétaux exposés au soleil, bien que la fonction chlorophyllienne donne naissance dans la profondeur des tissus à des quantités considérables d'oxygène naissant. On ne peut donc pas affirmer, sans réserves, qu'il n'y a pas de zymase dans la levure végétative parce qu'on n'en trouve pas; il serait peut-être plus prudent de dire qu'on ne peut pas la mettre en évidence parce que les moyens de l'obtenir deviennent tout de suite insuffisants là où il y en a peu.

Cela nous conduit à nous demander si l'alcool apparaît sous l'influence de la levure parce que la privation d'oxygène altère ses fonctions, ou plus simplement parce que cette condition la met dans l'impossibilité de tirer parti d'une transformation qui est dans l'ordre.

C'est cette dernière hypothèse que confirment les recherches que j'ai faites sur les rapports de l'oxygène avec les graines en voie de germination[2]. J'ai montré que les graines oléagineuses submergées conservent à peu près intactes leurs matières grasses pendant des semaines et des mois; mais les réserves amylacées des graines féculentes se dissolvent peu à peu sous l'influence des diastases; ce n'est pas un sucre réducteur qui s'accumule dans l'eau comme on aurait pu s'y attendre, c'est l'alcool; ainsi, l'amylase, la dextrinase, la maltase et la zymase

1. *C. R.*, t. CXXVIII, p. 1366.
2. *Ces Annales*, 1900, p. 350.

fonctionnent aussi bien en l'absence qu'en présence de l'oxygène ; toutes ces diastases ne font pas intervenir l'oxygène dans les changements qu'elles apportent à la constitution des aliments hydrocarbonés. J'ai établi également que si les huiles restent indemnes, c'est parce que l'oxygène fait défaut et j'ai fait remarquer que si les transformations des sucres ne dépassent pas le terme alcool, c'est parce que la cellule vivante ne peut pas modifier ce produit sans faire intervenir l'oxygène. C'est là une déduction par analogie et c'est un point qu'il faut démontrer directement.

J'examinerai donc de plus près les conditions de la production d'alcool par les graines ou les végétaux privés d'oxygène de façon à mieux en pénétrer le mécanisme ; je poursuivrai ensuite l'étude de l'assimilation des aliments ternaires pendant la période germinative en adoptant comme principe de rechercher des faits qui contredisent la conception que je viens d'esquisser ; et si, au contraire, j'en tire une confirmation, j'emprunterai des arguments plus probants aux végétaux microscopiques avec lesquels l'expérience se simplifie, en même temps qu'elle atteint un plus haut degré de précision.

II

Je vais d'abord compléter, par le tableau suivant, les renseignements que j'ai déjà fournis dans le mémoire auquel j'ai fait allusion et dans la note des *Comptes Rendus*[1], sur la production de l'alcool par les graines submergées.

TABLEAU I

1 Nos d'ordre.	2 Nombre de graines submergées.	3 Poids sec en grammes.	4 Volume d'eau distillée en c. c.	5 Durée de l'expérience.	6 Alcool recueilli 0/0 du poids des graines.	7 Perte tota de poids 0/0
			Pois.			
1	40	7,007	80	6 jours	2,34	10,58
2	id.	6,081	id.	12 —	4,63	17,33
3	id.	6,644	id.	27 —	6,56	27,26
4	100	15,845	100	4 —	4,63	10,88
5	id.	16,003	id.	13 —	10,54	25,78
			Haricot.			
6	20	8,594	50	7 —	1,86	»
			Lupin blanc.			
7	20	7,730	100	5 —	0,89	»
	id.	7,093	id.	—	1,53	11,33
	id.	7,006	id.	—	,28	17,47

[1] *C. R.*, t. CXXVIII, p. 1608

			Arachide.			
10	25	10,905	100	10 —	0,64	7,7
11	id.	10,196	id.	29 —	1,61	11,63
12	id.	10,551	id.	59 —	0,60	14,80
			Maïs.			
13	50	17,988	100	9 —	0,81	3,83
14	id.	18,032	id.	13 —	1,24	»

Les chiffres de la colonne 6, relatifs aux pois, dénotent une différence assez grande entre les divers lots submergés. Cette variation tient à deux causes : les lots nos 4 et 5 ont été immergés dans un volume d'eau relativement beaucoup plus faible que les 3 précédents. De plus, dans ceux-ci, on n'a évalué que l'alcool diffusé dans le liquide ambiant, tandis que dans les deux autres, on a évalué l'alcool total, celui qui a diffusé dans l'eau et celui qui a été retenu par les graines. Pour toutes les autres espèces, l'alcool produit a été évalué en totalité, dans les graines et dans l'eau ambiante.

Considérés dans leur ensemble, les chiffres de ce tableau montrent que la production d'alcool par les graines submergées est variable d'une famille à l'autre, et dans une même famille d'une espèce à l'autre.

Les pois sont des producteurs très actifs d'alcool; les haricots en donnent moins; le lupin blanc, moins aussi que le haricot; l'arachide, qui appartient comme les précédents à la famille des légumineuses, est la moins active de toutes les graines que j'ai examinées. Cela tient en partie à la nature des réserves : les pois et le haricot sont des graines presque exclusivement amylacées si l'on n'envisage que les réserves ternaires; le lupin blanc renferme beaucoup de sucres solubles, des matières grasses et pas d'amidon; l'arachide est très riche en huiles; elle renferme plus de 50 0/0 de son poids en matières grasses; mais à côté, il y a encore un peu d'amidon et des sucres. Plus il y a de matières grasses, moins l'aptitude à produire de l'alcool est marquée. J'ai montré en effet que les matières grasses ne sont pas atteintes dans ces conditions. On les retrouve intactes à peu près, après des semaines et des mois de submersion.

Les graminées représentées par le maïs produisent peu d'alcool, et solubilisent lentement l'amidon, à en juger par la faible perte de poids total accusée par l'expérience 13. On est surpris de ce résultat si l'on pense que le maïs est un végétal à germi-

nation extrêmement rapide, même à la température de 22-23°, à laquelle toutes ces expériences ont été réalisées. En moins de 24 heures quelquefois, la tigelle sort de sa gaine et la radicule également; au bout de 4-5 jours, la tige atteint 1 décimètre de long. Une évolution aussi active témoigne d'une digestion extrêmement énergique des réserves de l'albumen et du scutellum; on devrait en retrouver les effets dans les graines submergées. Si l'on observe le contraire, c'est parce que l'absence de plantule supprime la circulation des diastases sécrétées dans le scutellum qui doivent affluer dans l'albumen pour agir sur l'amidon, et des produits des actions diastasiques, sucres et dextrine, qui ne peuvent rencontrer de zymase ailleurs que dans le scutellum, la seule région vivante des semences de graminées. Ainsi nous voyons apparaître l'influence de la suppression de la plantule sur la marche de la digestion des réserves. C'est une constatation dont nous aurons à tenir compte dans d'autres circonstances.

Depuis la publication de mes premières observations. MM. Godlewsky et Polzeniusz[1] ont étudié de leur côté la question de la production d'alcool par les graines submergées. Ils se sont surtout attachés à démontrer que sa formation est due à une véritable fermentation alcoolique. Pour cela, ils ont opéré, en l'absence d'oxygène, dans un appareil clos, capable de supporter le vide et ils ont recueilli la totalité de l'alcool et de l'acide carbonique produits.

Ils ont ainsi trouvé que ces deux composés sont toujours dans la proportion fournie par une fermentation alcoolique pure. J'aurai l'occasion de confirmer ce résultat que je n'ai visé qu'indirectement.

MM. Godlewsky et Polzeniusz ont examiné aussi diverses espèces de graines au point de vue de leur aptitude à produire de l'alcool, lorsqu'elles sont placées sous l'eau. Dans cet ordre d'idées, ils ont obtenu des chiffres un peu plus élevés que ceux que j'ai fournis; mais le sens de leurs conclusions confirment mes résultats.

Je ne veux donc pas insister plus longtemps sur ce côté de la question qui ne présente, en somme, qu'un accident dans la vie du végétal, si on se borne à le considérer isolément. Il relève en effet de la propriété que possèdent les cellules végétales de

1. *C. R. de l'Académie des sciences de Cracovie*, 1901, p. 227.

produire de l'alcool, lorsqu'on les place dans une atmosphère privée d'oxygène, ainsi que l'ont montré depuis longtemps MM. Lechartier et Bellamy [1], Pasteur [2], Müntz [3].

Ce qu'il importe surtout, c'est de mettre en évidence la signification physiologique du phénomène.

Au lieu d'immerger les graines de pois dans l'eau, on a pris des cotylédons débarrassés de leurs embryons, et on les a placés sur des perles de verre, avec une quantité suffisante d'eau distillée; ils se trouvaient ainsi dans les conditions requises pour provoquer une germination rapide chez des pois entiers.

Voici les résultats fournis par trois expériences. Dans la première, on n'a pris aucune précaution pour retenir l'alcool, les cotylédons étaient placés dans un vase fermé simplement par un tampon coton. Les deux autres ont été réalisées dans un appareil clos, dont on trouvera la description plus loin, p. 211, permettant de recueillir l'alcool et l'acide carbonique.

TABLEAU II

Nos d'ordre.	Poids sec des graines entières en milligr.	Nombre de cotylédons.	Durée de l'expérience.	Alcool recueilli en milligr.	Acide carbonique dégagé, en milligr.
1	»	61	21 jours	98	»
2	1945	23	8 —	150	260,5
3	1855	21	8 —	170	231,8

Dans le nº 1 il y a eu une perte assez élevée d'alcool; on conçoit qu'il n'en saurait être autrement, si l'on fait remarquer que les cotylédons sont exposés par toute leur surface à l'air atmosphérique.

Dans les nos 2 et 3, on voit qu'il s'est formé plus d'acide carbonique que n'en fournirait, pour les quantités d'alcool trouvé, une véritable fermentation alcoolique.

Le contact libre avec l'oxygène atmosphérique modifie donc la marche de la digestion des réserves; mais avant de conclure que l'alcool se montre ici comme un produit normal, il faut montrer que la plante est capable de l'utiliser; en attendant, on ne saurait se refuser à admettre que les conditions de formation d'alcool dans les cotylédons exposés à l'air sont exactement les mêmes que celles qui favorisent l'évolution de l'embryon; l'absence de plantule ne peut pas être invoquée

1. *C. R.*, 1869, t. LXIX, p. 356, 466; t. LXXV, 1872, p. 1203; t. LXXIX, 1874, p. 946 et 1066.
2. *C. R.*, t. LXXV, 1872, p. 754 et 1054.
3. *C. R.*, t. LXXXVI, p. 49.

pour expliquer l'apparition de l'alcool; il est vrai que la transpiration active la circulation de la sève, mais les cotylédons de pois conservent pendant toute la durée de la germination un volume constant; quand ils ont atteint leur turgescence maximum, ils ne se modifient plus, et les rapports des cotylédons adhérents à la plante avec l'air atmosphérique doivent être les mêmes que chez ceux qui sont débarrassés de leurs embryons. On va voir par les expériences suivantes qu'il en est bien ainsi.

Faisons germer des pois, toujours à l'abri des microbes, et quand les plantules ont atteint quelques centimètres de longueur, recouvrons-les d'eau distillée, de façon à ce que le niveau de l'eau dépasse les plus longues de quelques millimètres.

On remarque tout de suite que le développement s'arrête; à part cela, les plantes ne présentent rien d'anormal pendant 5 ou 6 jours. Puis, brusquement, elles changent d'aspect; les tiges deviennent translucides; le cylindre central se détache sur toute la longueur suivant une ligne opaque; c'est le signe que les cellules ont subi le phénomène de la plamolyse, que les méats sont remplis d'eau. Les plantes sont mortes. Si on recherche l'alcool, on en trouve des quantités encore plus abondantes que si les cotylédons seuls avaient subi le traitement.

Voici, pour fixer les idées, la quantité d'alcool recueilli dans une expérience exécutée dans ces conditions.

On fait germer 20 pois à l'obscurité, à la température de 22-23° pendant 7 jours. Les tigelles ont environ 3 centimètres de longueur. On les couvre d'eau distillée; au bout de 5 jours, on observe les phénomènes qui caractérisent la mort des plantes et on met fin à l'expérience. On trouve dans le liquide 130 milligrammes d'alcool, ce qui fait à peu près 3,25 0/0 d'alcool du poids initial des graines, et on n'avait pris aucune précaution pour éviter les pertes par évaporation.

Si, au lieu de recouvrir d'eau toutes les plantules, on a soin de s'arrêter à un niveau tel qu'une petite partie seulement du bourgeon terminal de deux ou trois tiges émerge du liquide, celles-ci continuent de pousser sans manifester le moindre trouble. Leurs voisines meurent après avoir produit de l'alcool qui s'est diffusé dans l'eau.

Quelle est l'interprétation qu'on peut donner de ce résultat? Si l'on admet que la partie laissée à l'air a permis à l'oxygène

de circuler librement, en quantité suffisante, jusque dans la profondeur des cotylédons et l'extrémité des racines pour prévenir la formation d'alcool, on ne saurait s'étonner de les voir pousser; mais même en admettant qu'il en soit ainsi, il y a encore une conclusion intéressante qui s'impose : l'alcool déversé par les plantules submergées dans l'eau passe avec elle dans les tiges qui se développent, en raison de l'appel incessant provoqué par la transpiration; si celles-ci ne l'utilisaient pas, elles subiraient le même sort que les autres qui meurent; elles font donc disparaître l'alcool, et aussi l'aldéhyde qui l'accompagne, car je dois ajouter que c'est surtout l'aldéhyde qui tue les plantes submergées et non l'alcool[1].

Mais il me paraît un peu hardi d'affirmer que la circulation de l'air peut être assurée dans toute l'étendue du végétal, par la petite portion qu'on a laissé émerger de l'eau. L'interprétation de M. Duclaux est beaucoup plus rationnelle. Les cotylédons et les régions submergées des tiges sont soumises à l'asphyxie comme les plantes entièrement recouvertes par l'eau ; ces régions produisent donc aussi de l'alcool ; mais il est brûlé au fur et à mesure de sa formation en même temps que celui qui est apporté par l'eau ambiante ; le siège de la combustion, je veux dire de l'utilisation, est placé dans la portion aérienne, qui présente cette double condition d'absorber de l'oxygène à discrétion et d'être un foyer très actif de transformations alimentaires puisqu'elle est exclusivement constituée par des cellules jeunes en voie de multiplication ou de différenciation.

Quelle que soit donc la façon dont on envisage les conséquences de cette expérience, on a le droit d'en conclure que les plantules de pois traitées comme je l'ai dit utilisent l'alcool et même l'adéhyde.

Mais considérons cette conclusion comme un accident, puisqu'en somme elle se présente comme la suite d'un accident, et cherchons à vérifier les conséquences de la production nécessaire de l'alcool, comme acte préparatoire à l'assimilation, non plus sur des phénomènes provoqués, mais sur ceux qui se présentent comme la manifestation de la vie normale des végétaux.

1. Mazé, ces *Annales* (*loc. cit.*).

III

La remarque suivante va nous suggérer tout de suite les expériences destinées à mettre en relief l'existence probable de la transformation des sucres en alcool, même chez les végétaux poussant dans les conditions ordinaires de la vie végétale; les hydrates de carbone fermentescibles perdent, en se disloquant en alcool et acide carbonique, à peu près la moitié de leur poids sous une forme inutilisable pour les végétaux dépourvus de chlorophylle. Si l'alcool est la fraction retenue et utilisée à la construction de nouveaux tissus ou à l'entretien des cellules déjà formées, le poids de végétal édifié aux dépens d'une quantité donnée de sucre ne sera jamais égal à la moitié du poids des sucres consommés; mais si l'on opère, comme je le fais ici, sur des plantes considérées seulement pendant la période germinative, il faut faire une réserve; il y a toujours dans les graines des substances azotées qui contiennent également beaucoup de carbone, d'hydrogène et d'oxygène; ces aliments concourent à la constitution de la plantule; or on ne sait rien sur leur mode de désintégration, et il est possible et même probable que la fraction des composés azotés utilisés soit supérieur à la moitié des molécules initiales.

Lorsqu'on établit le rapport entre le poids de végétal fabriqué et le poids correspondant perdu par les organes de réserves, ou, pour abréger, le rendement, on obtient la résultante de la contribution des hydrates de carbone d'une part, et des matières azotées d'autre part. On ne peut donc pas demander à cette méthode plus de précision qu'elle ne comporte; mais comme ce sont en général les hydrates de carbone qui prédominent, leur influence demeurera prépondérante, on s'en convaincra d'ailleurs par l'examen des chiffres fournis par l'expérience.

On peut trouver chez les auteurs, même déjà anciens, des renseignements sur cette question; mais on comprend qu'on ne puisse pas les utiliser parce qu'ils ont été obtenus par la mise en œuvre d'une technique insuffisante. On sait, en effet, que lorsqu'on fait germer des graines dans le sable ou dans la terre, les microbes prélèvent sur les substances de réserve une dîme

assez lourde, même chez les organes qui semblent en apparence tout à fait sains.

La graine de choix pour de semblables expériences est le pois ; le pois ne renferme que des réserves hydrocarbonées et azotées. Les matières solubles dans l'éther sec ne représentent pas 1 0/0 du poids total de la graine, et encore ce sont plutôt des résines que des matières grasses proprement dites.

J'ai donc soumis à la germination quelques lots de pois à l'abri des microbes ; et j'ai évalué le poids de plante fabriquée à l'aide des substances empruntées aux cotylédons. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau suivant :

TABLEAU III

1	2	3	4	5	6	7
Nos d'ordre.	Poids sec des graines	Durée de la germination.	Poids des cotylédons après l'expérience.	Poids perdu par les cotylédons.	Poids des plantules.	Rendement
	Milligr.	Jours.	Milligr.	Milligr.	Milligr.	
1	3954	9	3019	935	546	0,58
2	7218	12	5099,4	2118,6	950,3	0,45
3	8052	11	6222	1830	782	0,42
4	2042	15	8406	3636	1540	0,42

Les chiffres de la colonne 7 montrent que, pendant la première période de la germination, le rendement est plus grand que 0,5 ; ce fait peut être attribué à l'influence des matières azotées ; mais il est dû à une autre cause, au moins en partie : au début de la germination, la solubilisation des réserves marche plus vite que la consommation par la plantule ; les substances non utilisées s'accumulent principalement dans la tige où les matières amylacées sont représentées par de l'amidon transitoire et des sucres réducteurs ; ces aliments non consommés ne devraient pas entrer en ligne de compte dans l'évaluation du rendement ; les chiffres obtenus sont donc trop élevés ; cette observation est d'ordre général ; elle s'applique à toutes les espèces de graines.

Ceci étant dit, on voit que les rendements obtenus rentrent dans la limite prévue. Il est inutile de prolonger la durée de la germination, car on conçoit aisément que le rendement doit diminuer avec les progrès des plantules.

Après avoir examiné un type de graines amylacées, il était tout indiqué de faire les mêmes observations sur des graines à réserves ternaires mixtes, comme le maïs et le lupin blanc, puis

enfin sur des graines à réserves oléagineuses parmi lesquelles le ricin et l'arachide sont tout indiqués.

Le maïs est plutôt une graine amylacée; mais il renferme aussi des huiles localisées surtout dans le scutellum; en raison de cette situation, ces huiles sont digérées dès le commencement de la germination; c'est donc au début de l'évolution de la plantule que l'on pourra constater l'influence du mode d'utilisation de matières grasses sur les plantules.

Les expériences qui suivent ont été conduites d'une façon un peu différente de celles qui ont été exécutées sur le pois. Les graines ont été mises à germer dans des tubes à essai sur du coton imbibé d'eau, à raison d'une graine par tube. Ce procédé donne de bons résultats avec les semences volumineuses, qui fournissent en peu de temps un poids de végétal assez élevé; il présente en outre l'avantage de choisir à volonté les plantules qui lèvent bien, ce qui permet d'obtenir des résultats comparables.

Les chiffres suivants ont été obtenus avec le maïs :

TABLEAU IV

1	2	3	4	5	6	7
Nos d'ordre.	Poids sec des graines.	Durée de la germination.	Poids des réserves non utilisées.	Poids perdu par l'albumen.	Poids des plantules.	Rendement.
	Milligr.	Jours.	Milligr.	Milligr	Milligr.	
1	502,7	4	463	39,7	32,5	0,82
2	447,5	5	391,5	56	46	0,82
3	300,2	15	278	222,2	133,5	0,60
4	402,2	16	263,7	138,5	79,8	0,57
5	352,4	20	69,6	282,8	165,2	0,58
6	370	26	180	190	92,5	0,48

Les chiffres de la colonne 7 indiquent cette fois que le maïs ne suit pas la règle, posée *a priori*, concernant le mode d'utilisation des matières hydrocarbonées. Il faut voir, dans cette divergence, l'intervention des matières grasses; mais. d'un autre côté, on verra plus loin que les plantules de maïs renferment plus d'aliments non utilisés que le pois; c'est une raison de plus qui parle en faveur d'un rendement élevé.

Tout les physiologistes admettent aujourd'hui que les huiles se transforment en sucres avant d'être utilisées à l'édification de la plantule; si cette transformation est intégrale, on conçoit qu'un poids donné de matières grasses fournisse un poids de végétal supérieur à celui qui s'obtient par l'assimilation d'un poids égal

de substances hydrocarbonées; cette transformation se fait par fixation d'oxygène atmosphérique; si elle n'est pas accompagnée de perte de carbone, elle conduit à un poids de sucres au moins double du poids des substances oléagineuses qui leur ont donné naissance. Si les sucres une fois formés subissent un dédoublement préalable en alcool et acide carbonique, le poids de matière utilisable représentera, à peu de chose près, la quantité primitive de matières grasses, de sorte que le poids de plante fabriqué, rapporté aux huiles consommées, sera égal à l'unité. C'est ce qu'on va vérifier dans un instant. Quand les réserves ternaires sont constituées, comme chez le maïs, par un mélange d'huiles et d'hydrates de carbone, le rendement devra être également supérieur à 0,5; envisagés de cette façon, les chiffres du tableau IV ne présentent pas d'ambiguïté.

Les résultats que j'ai obtenus avec le lupin blanc donnent lieu aux mêmes observations, avec cette différence qu'ils s'écartent encore plus des chiffres prévus pour le pois.

Le lupin blanc renferme en effet 12,54 0/0 de matières solubles à l'éther sec; le maïs n'en contenait que 4,82 0/0. Le lupin blanc que j'ai utilisé renfermait en outre, 7 à 8 0/0 de sucres évalués en glucose, et pas d'amidon; dans cette graine ce sont les réserves azotées qui prédominent; et pour cette raison, les chiffres consignés dans le tableau suivant ne peuvent fournir que des indications assez vagues.

TABLEAU V

1 Nos d'ordre.	2 Poids sec des graines.	3 Durée de la germination.	4 Poids des cotylédons.	5 Poids perdu par les cotylédons.	6 Poids des plantules.	7 Rendement.
	Milligr.	Jours.	Milligr.	Milligr.	Milligr.	
1	474,9	3	444	30,9	20	0,64
2	411,2	5	340,5	70,7	52	0,73
3	461,2	6	381,5	81,7	61,5	0,76
4	412	10	267	145	102	0,70
5	469,4	12	329,3	140,1	103	0,73
6	434	15	194,5	239,5	175	0,73

Le caractère le plus saillant des chiffres qui expriment le rendement, c'est leur constance; ce fait doit appeler l'attention sur le mode d'utilisation des matières azotées; il semblerait indiquer en outre que l'assimilation des matières grasses se fait lentement, parallèlement à celle des matières azotées; mais ce n'est là qu'une simple supposition; il se peut, comme je l'ai déjà

dit, que les substances protéiques de réserves fournissent un poids de végétal supérieur à 0,5; mais l'examen de cette question ne rentre pas dans les limites de ce travail. Je me contenterai de faire remarquer que les aliments les plus facilement assimilables de la graine de lupin blanc sont les sucres; selon toute vraisemblance, ce sont eux qui disparaissent les premiers, et cette particularité se traduit par le rendement assez curieux 0,64.

Parmi les graines oléagineuses on a le choix entre le ricin et l'arachide; mais j'ai été contraint à me borner à l'étude de la germination de l'arachide, car le ricin ne germe pas si on le soumét aux conditions imposées par ce procédé d'expérimentation [1].

Le tableau VI donne les résultats fournis par l'arachide.

TABLEAU VI

1	2	3	4	5	6	7
Nos d'ordre.	Poids sec des graines.	Durée de la germination.	Poids des cotylédons.	Poids perdu par les cotylédons.	Poids des plantules.	Rendement
	Milligr.	Jours.	Milligr.	Milligr.	Milligr.	
1	402,4	6	353,5	49	45,5	0,93
2	585,6	10	426	159,6	152,5	0,96
3	448,8	17	361,5	87,3	91,5	1,05
4	405,2	20	152,5	252,7	221,5	0,88
5	360	24	51,1	308,9	293,5	0,95
6	422	26	121,2	300,8	228	0,77
7	495,8	30	114	381,8	302	0,82
8	393,2	35	79,8	313,4	211	0,67

L'examen de ces chiffres conduit à la conclusion prévue, le rendement croît pendant la première période de la germination; on en trouve facilement l'explication dans ce fait que la graine d'arachide renferme de petites quantités d'amidon et des sucres,

1. Cette graine placée sur du coton imbibé d'eau n'entre jamais en germination; il en est de même sur les perles de verre, soit qu'on l'immerge en partie ou qu'on la mette simplement en contact avec l'eau, soit qu'on la place au contraire à une certaine hauteur au-dessus du niveau du liquide. Ce résultat tient probablement à la constitution anatomique de la graine. on sait quelle est composée d'un périperme et d'un embryon muni de deux feuilles cotylédonaires accolées l'une à l'autre, entourés de toutes parts par le périsperme.

L'espace qui sépare les cotylédons et celui qui les isole du périsperme n'existent que virtuellement; mais comme ces organes sont simplement juxtaposés, ils se laissent envelopper par voie de capillarité par une mince couche liquide, dès que la graine touche l'eau; elle est donc placée à peu près dans les mêmes conditions que si elle avait été entièrement submergée; on ne peut pas en effet attribuer la non-germination au procédé de stérilisation, car des graines maintenues sur des perles de verre pendant des semaines et des mois germent très bien quand on les place dans du sable très poreux et modérément mouillé.

ceux-ci évalués en glucose représentent en moyenne, pour l'échantillon de graines qui m'a servi, 4 0/0 du poids sec des semences; c'est évidemment aux dépens de ces sucres que la plantule effectue son premier développement; le rendement croît peu à peu à mesure que les matières grasses contribuent pour une part plus large à l'édification de la plante, pour décroître ensuite lorsque la somme des pertes réunies de construction et d'entretien dépasse le gain réalisé sous forme de fixation d'oxygène sur les matières grasses.

Mais, dans tous les cas, le rendement oscille dans le voisinage de l'unité pendant la période de temps que l'on peut considérer comme représentant la durée normale de la germination.

J'aurai pu multiplier davantage ces expériences; mais je pense qu'on n'en aurait pas tiré grand profit; les exemples que j'ai rapportés s'appliquent aux différents types de graines que l'on peut rencontrer; ils résument bien les faits que je voulais mettre en évidence, et comme on a pu le remarquer, aucun d'eux n'est en opposition avec la possibilité de la transformation de la totalité des réserves ternaires en alcool et acide carbonique avant l'incorporation de leur carbone à la substance vivante.

Mais on ne peut pas leur demander la démonstration de ce fait; mieux que cela, l'affirmation que je viens d'énoncer suppose implicitement, chez ces diverses espèces végétales, un mode d'utilisation unique des aliments ternaires dont elles disposent; il se peut que les choses se passent autrement; les huiles fournissent un meilleur rendement parce qu'elles donnent moins de déchets à la digestion; mais le déchet se traduit par la production d'eau et d'acide carbonique; s'il y a moins d'acide carbonique éliminé chez l'arachide que chez le pois pour l'édification de l'unité de poids de végétal, on s'explique que celle-là fournisse un meilleur rendement que celui-ci; mais la quantité d'acide carbonique produit est susceptible d'être mesurée; c'est donc un point sur lequel on peut se renseigner.

D'un autre côté, on s'est appuyé dans le cours de ces expériences sur ce fait que les matières grasses subissent une transformation préalable en sucres avant d'être utilisées par la plantule. En réalité, l'existence de cette transformation n'a été prouvée que chez le ricin [1]; on ne possède pas de démonstration

1. Maquenne, *C. R.*, t. CXXVII, p. 625.

directe de ce fait pour toutes les autres graines oléagineuses. On a été conduit à l admettre par des raisonnements d'analogie. On sait que les sucres constituent pour les végétaux l'aliment ternaire par excellence. Le dextrose, le lévulose, le galactose et le mannose se présentent comme directement assimilables; et on a constaté que partout où ils se rencontrent, dans les semences ou dans les feuilles, concurremment avec d'autres substances plus complexes, ce sont eux qui disparaissent les premiers pendant que les autres se dégradent à leur tour et passent par les mêmes états avant de servir à l'alimentation.

Les graines oléagineuses renferment, à côté d'une forte proportion de matières grasses, des quantités plus ou moins grandes de sucres et souvent de l'amidon; ce sont évidemment les hydrates de carbone qui sont, en grande partie, consommés les premiers. de sorte que si l'on trouve, à un moment quelconque de la germination, une quantité de sucres plus faible ou plus élevée que la quantité initiale, on peut affirmer qu'ils dérivent des substances grasses; ce raisonnement est d'autant plus logique que la valeur du rapport $\frac{CO^2}{O}$ semble en confirmer la conclusion; le quotient respiratoire est voisin de l'unité pour les graines amylacées comme le pois; sa valeur baisse avec la richesse des semences en huiles. elle tombe à 0,60 chez le ricin et elle se maintient dans le voisinage de ce chiffre pendant que la plantule consomme les huiles.

Que ce raisonnement par analogie traduise ou non la réalité, il n'en est pas moins vrai que, pour asseoir sur cette déduction des arguments destinés à étayer les résultats fournis par de nouvelles expériences, il faudrait d'abord s'assurer de son exactitude.

IV

Commençons par établir qu'il n'existe pas chez les végétaux supérieurs, ceux du moins qui ne renferment comme réserves ternaires que des hydrates de carbone et des huiles, plusieurs modes d'utilisation du carbone ternaire. On peut, comme je l'ai fait remarquer, s'en rendre compte par la mesure de la quantité de CO^2 qui correspond à l'élaboration d'un poids donné de végétal. Si elle est la même chez les différentes espèces de graines,

on aura le droit de conclure que le rendement élevé constaté chez les graines oléagineuses n'est pas dû à un mode d'assimilation plus économique que celui qui se déroule dans les semences amylacées.

Voici les chiffres que j'ai déjà publiés sur cette question[1].

	CO^2 dégagé 0/0 de plante fabriquée.	Durée de l'expérience.
	—	—
Arachide........................	95,66	10 jours.
Maïs............................	88,49	8 —
Haricot...	88,6	8 —
Pois............................	1,3	8 —

J'ai repris ces expériences dans le but de pénétrer plus avant dans le mécanisme du phénomène.

Voici comment elles ont été réalisées : les graines débarrassées de microbes sont placées sur des perles de verre avec une quantité suffisante d'eau distillée. Le récipient dans lequel elles sont disposées est un vase conique de 300 c. c. de captivité, assez fort pour résister au vide; son col est muni d'un étranglement au-dessous duquel se trouve une tubulure latérale munie aussi d'étranglements, qui, comme le précédent, ont pour but de fixer en place des tampons de coton; ce vase est fermé par un bouchon en caoutchouc, percé d'un trou qui livre passage à un tube pourvu aussi d'un tampon de coton. L'appareil ainsi monté est stérilisé à 120° pendant un quart d'heure, et il est alors prêt à recevoir les graines.

Pour recueillir l'acide carbonique, et aussi pour favoriser la germination, on fait circuler un courant d'air dans le récipient; il faut donc dépouiller l'air de l'acide carbonique qu'il renferme normalement; ce résultat s'obtient par l'interposition en avant du vase conique : 1° d'un barboteur à potasse concentrée; 2° d'un tube en U rempli de fragments de potasse caustique; 3° d'un barboteur à eau destiné à restituer à l'air la vapeur d'eau qu'il a perdue, afin de prévenir une trop grande évaporation du liquide de germination.

Après avoir passé dans le vase conique, l'air cède sa vapeur d'eau : 1° à une éprouvette remplie de chlorure de calcium fondu; 2° à un tube en U de grandes dimensions rempli de ponce sulfurique. Il circule ensuite dans une série de récipients tarés destinés à donner, par leur augmentation de poids, l'acide carbonique cherché; ils comprennent : un tube en U à ponce sulfurique, un barboteur Liebig modifié à potasse concentrée, un deuxième tube à ponce sulfurique, un tube en U rempli de fragments de potasse caustique, un troisième tube à ponce sulfurique. Enfin, une éprouvette remplie de chlorure de calcium fondu empêche le retour de la vapeur d'eau de l'aspirateur qui n'est autre qu'une trompe à eau. Tous les raccords de l'appareil sont constitués par du caoutchouc à vide. Une pince à vis placée en avant du récipient à graines permet d'interrompre à volonté la communication avec la partie antérieure de l'appareil, tandis qu'une autre isole la

1. *C. R.*, t. CXXX, p. 424.

deuxième éprouvette de chlorure de calcium de la trompe et sert en outre à régler la vitesse du courant d'air.

Pour recueillir l'acide carbonique retenu par les cotylédons, on fait le vide deux fois dans l'appareil, pendant qu'on soumet les graines à une température croissante qui monte lentement jusqu'à 65°.

Quand on voulait recueillir l'alcool produit, suivant les conditions de l'expérience, on intercalait, entre le récipient qui renfermait les graines et la première éprouvette à chlorure, un double barboteur à eau distillée plongeant dans la glace fondante, laquelle était protégée contre la chaleur rayonnante par un système de deux bocaux en verre laissant entre leurs parois un espace assez large qu'on remplissait de coton ; on en recouvrait aussi toute la partie supérieure du bocal intérieur.

Toutes les expériences qui suivent ont été faites à la température de 29-30° dans une étuve complètement obscure, éclairée faiblement par un bec papillon pendant le temps nécessaire aux manipulations.

Voilà, au point de vue de l'installation, les conditions dans lesquelles je me suis placé.

Pour mettre en relief l'importance des résultats et faire ressortir clairement les renseignements que je leur demandais, j'ai toujours mené de front deux ou quatre expériences. A côté d'une expérience destinée à évaluer la quantité d'acide carbonique produit par la construction et l'entretien d'un poids donné de plante, j'ai installé parallèlement une autre expérience portant sur le même poids de graines placées dans les mêmes conditions, mais préalablement débarrassées de leurs embryons[1].

Les résultats que j'ai obtenus avec le pois sont résumés dans le tableau VII.

Parmi toutes ces expériences, il y en a qui dénotent une germination très médiocre ; ce sont les expériences 2 et 3 ; dans l'expérience 1, la germination a été passable ; 4 et 5 attestent une évolution rapide de la plantule.

Ces différences tiennent à l'âge des semences ; les pois conservés 7 ou 8 mois germent mal dans les conditions imposées par ces expériences ; ils sont placés dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau et semblent souffrir de l'absence de transpiration active ; ce ne sont pas les opérations auxquelles on les

1. L'ablation de l'embryon est facile lorsqu'il s'agit de graines de maïs ou d'arachide ; mais les pois doivent subir un trempage préalable de 24 heures ; ce trempage doit être fait, précédé d'une stérilisation des graines d'une part, et de l'eau dans laquelle on les submerge d'autre part. L'excision des embryons doit être faite dans des conditions d'asepsie rigoureuse, et pour plus de précaution on soumet les cotylédons ainsi préparés à une série de nouveaux lavages avec de l'eau stérile.

TABLEAU VII

		1		2		3		4		5	
		Graines germées.	Graines germées.	Graines germées.	Cotylédons.	Graines germées.	Cotylédons.	Graines germées.	Cotylédons.	Graines germées.	Graines submergées
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Poids initial des graines........	Milligr.	2009,6	2042,3	2097,6	2107	2025,8	2025,8	1972	1972	2340	2340
Durée de l'expérience...........	Jours..	6	6	7	7	10	10	6	6	6	6
Poids des plantules.............	Milligr.	137,9	103,2	40	»	53,7	»	225	»	235	»
Poids des cotylédons............	—	1624,7	1690,8	1651,8	»	»	»	1494	»	1835	»
Extrait sec dans le liquide	—	78,2	61,8	15,7	»	»	»	39,4	»	73,9	»
CO^2..........................	—	535	289,3	268,9	238,8	350,8	298,4	292,9	240,6	319,4	243,7
Différence CO^2 graine — CO^2 cotyl.	—	»	»	+30,1	»	+52,4	»	+52,3	»	+75,7	»
Rapport$_1$ $\frac{CO^2 \text{ graines}}{\text{Plantules}}$..........		2,42	2,8	6,72	»	6,51	»	1,3	»	1,35	»
Rapport$_2$ $\frac{\text{Diff. } CO^2 \text{ gr.} - CO^2 \text{ cotyl.}}{\text{Plantules}}$		»	»	0,75	»	0,97	»	0,23	»	0,32	»

a soumises pour les débarrasser de microbes qui ont affaibli leur pouvoir germinatif, car si on les place dans du sable, elles germent très bien[1]. Pour obtenir de bons résultats, il faut prendre les graines sur la plante même, au moment où les gousses sont bien sèches. Les expériences 4 et 5 ont été faites avec des pois récoltés dans la gousse. Faute de prendre ces précautions on s'expose à avoir des résultats dénués de valeur, car l'expérience comparative faite avec des cotylédons ne suffit pas à faire disparaître les irrégularités. La ration d'entretien des plantules qui se développent lentement représente une fraction trop élevée des aliments consommés.

Le fait le plus intéressant qui se dégage des chiffres du tableau VII, c'est l'activité des échanges gazeux entre l'atmosphère et les cotylédons privés de leurs embryons; ils produisent, à peu de chose près, autant d'acide carbonique que les graines pourvues de leur plantule.

J'ai déjà fait remarquer qu'il n'y a aucune raison d'admettre que les cotylédons isolés de l'embryon agissent sur leurs réserves d'une façon différente des graines entières, les uns et les autres étant placés dans les conditions favorables à la germination. Tout au plus peut-on supposer que l'oxygène pénètre plus facilement dans les profondeurs des cotylédons lorsqu'ils tiennent à la plantule, en faveur de l'irrigation que celle-ci y provoque ; mais cela ne peut que favoriser le dégagement d'acide carbonique et les chiffres fournis par l'expérience précédente pour les cotylédons sont peut-être inférieurs à ceux que l'on obtiendrait avec ces organes adhérents à la plante, si on en pouvait faire le départ. Cela veut dire que le travail préparatoire de l'assimilation s'effectue dans les cotylédons jusqu'au terme alcool et au delà, de sorte que l'on peut dire cette fois que l'alcool est non pas un produit accidentel ainsi que je l'ai admis provisoirement, mais une substance que les organes de réserve préparent normalement et régulièrement, du moins chez le pois.

Je ne veux pas dire par là que les hydrates de carbone de

1. Ce résultat constitue une traduction expérimentale de ce fait d'observation courante que le pouvoir germinatif va en s'affaiblissant avec la durée de conservation des graines. A une époque où elles semblent avoir gardé cette faculté intacte, puisqu'elles germent très bien dans le sable humide, la germination en atmosphère saturée décèle une atténuation de l'activité diastasique, comparativement avec les semences prises au moment de la maturité.

réserve subissent intégralement cette transformation dans les cotylédons; ce serait nier l'évidence, car tout le monde sait que la plantule reçoit en même temps de la dextrine, des sucres réducteurs, que l'on trouve dans les cellules de la plante, soit à l'état d'amidon transitoire, soit à l'état de sucres.

Ces substances sont toujours abondantes, et beaucoup plus que l'alcool; cela se conçoit puisque c'est celui-ci qui est consommé le premier; mais l'alcool n'est jamais absent non plus, et chaque fois que j'ai voulu vérifier sa présence, j'ai toujours réussi à le caractériser.

Remarquons en outre que les graines entières submergées de l'expérience 5, produisent à peu près la même quantité d'acide carbonique que les cotylédons exposés à l'air; ces graines ont donné naissance à 210 milligrammes d'alcool. Étant donnée la difficulté de retenir tout l'alcool, le rapport de l'acide carbonique à l'alcool formé, même dans les graines submergées en présence de l'air, montre bien que ce phénomène est régi par la même loi suivant laquelle s'effectue la fermentation alcoolique pure. Cela confirme la conclusion de MM. Godlewsky et Polzeniusz; mais ce qui est intéressant surtout, c'est de constater par cette expérience qu'il n'existe aucune diastase capable de dégager de l'acide carbonique, aux dépens des matières azotées de réserve, en l'absence d'oxygène. C'est une remarque qui a sa valeur et que j'aurai l'occasion de faire avec l'*Eurotyopsis Gayoni*. Ce qui se dégage de tous ces faits, c'est que dans les graines submergées, dans les cotylédons exposés à l'air ou dans ceux qui restent attachés à la plantule qu'ils alimentent, le mécanisme de la formation d'acide carbonique est partout le même; il est dû à une même cause qui agit partout avec la même activité. C'est dire qu'il n'y a pas, du moins chez le pois, deux modes d'action de la cellule vivante vis-à-vis de ses aliments, caractérisant la vie végétative ou la vie fermentative; il n'y a que des manifestations différentes, en apparence seulement, d'un mode de vie unique, suivant les conditions que nous imposons à la cellule vivante, ou qu'elle se crée elle-même plus ou moins accidentellement, par le jeu des forces physicochimiques qu'elle met en œuvre.

Les graines de pois germant normalement à la faveur des conditions favorables à leur évolution produisent de l'alcool et

l'utilisent à la construction de leurs tissus. Les mêmes graines placées dans l'eau, ou dans une atmosphère privée d'oxygène, produisent de l'alcool qu'elles ne peuvent utiliser parce que l'oxygène fait défaut; elles ne construisent pas de substances vivantes.

Prenons maintenant les chiffres des premières colonnes des expériences 4 et 5, et faisons le bilan du poids de matière soumise à l'expérience. On obtient les résultats suivants :

TABLEAU VIII

	Expérience 4.	Expérience 5.
	Milligr.	Milligr.
Poids des plantules................	225	235
Poids cotylédons....................	1494	1835
Extrait dans l'eau..................	39,4	73,9
Acide carbonique dégagé..........	292,2	319,4
Total après l'expérience...	2051,3	2463,3
Poids initial..............	1933	2340
Différence................	+ 118,3	+ 123,3

Que représente cette différence? l'eau d'hydratation des matières ternaires et surtout l'oxygène emprunté à l'atmosphère. Mais on sait que le volume d'oxygène absorbé, par le pois en voie de germination est très voisin du volume d'acide carbonique dégagé. Dans ces conditions, l'oxygène absorbé, calculé d'après l'acide carbonique obtenu, est, dans l'expérience 4, 213 milligrammes et 232,3 dans l'expérience 5, c'est-à-dire 2 fois plus que l'excédent de poids observé que l'on ne saurait cependant rapporter en entier à l'oxygène fixé.

Il y a donc environ la moitié de l'oxygène libéré par l'acide carbonique qui provient de l'oxygène des composés de réserve, et la moitié de l'oxygène emprunté à l'atmosphère qui a dû se combiner à l'hydrogène pour s'éliminer à l'état d'eau.

Il semble que l'on puisse dire le contraire, et traduire cette observation de la façon suivante : l'acide carbonique se forme par la combinaison directe de l'oxygène atmosphérique avec le carbone de la plante, et c'est l'oxygène des substances de réserve qui a fourni le déficit constaté en s'éliminant à l'état d'eau. Cette manière de voir est contredite par les faits, et c'est la première conclusion qui traduit la réalité. Si l'on fait remarquer en outre que la portion d'oxygène empruntée à l'atmosphère qui se retrouve dans l'acide carbonique a dû se fixer sur les substances alimentaires, comme dans l'exemple de la transformation des

matières grasses en sucres, pour se dégager par des mutations ultérieures, on est conduit à cette notion qu'il n'y a, probablement, aucune corrélation entre l'absorption d'oxygène et le dégagement d'acide carbonique. M. Duclaux insiste longuement sur ce fait[1].

J'ai fait les mêmes expériences avec le maïs et avec l'arachide; les résultats qu'ils m'ont fournis sont exposés dans le tableau IX.

Le maïs a très bien germé comme on le voit; c'est d'ailleurs une plante qui s'accommode fort bien à l'humidité; l'arachide a fourni des résultats moins bons; et comme on ne peut pas récolter ses graines soi-même, il est bien difficile de prévenir cet inconvénient; cependant, dans mes premières expériences, j'avais obtenu une germination très satisfaisante (voir p. 211):

Les éléments du tableau IX qu'il s'agit de mettre en parallèle avec ceux qui sont relatés dans le tableau VIII, concernent les différentes valeurs trouvées pour les rapports $_1$ et $_2$. Ces rapports représentent, comme on l'a vu, la quantité d'acide carbonique dégagé, pendant toute la durée de l'expérience, par l'unité de poids de plante pourvue de ses cotylédons, et par l'unité de poids de plantule. Les rapports $_1$ sont fournis directement par l'expérience; les rapports $_2$ ont été obtenus en calculant la différence entre l'acide carbonique éliminé par les végétaux entiers et celui qui a été dégagé par les cotylédons privés de leurs embryons, et en divisant le chiffre obtenu par le poids des plantules; cette différence doit être mise en effet, avec pourtant quelques réserves, sur le compte des plantules.

Pour plus de commodité je réunis ci-dessous les principaux chiffres obtenus :

TABLEAU X

	Pois.	Maïs.	Arachide.
Rapport $_1$	1,3	0,94	1,18
Rapport $_2$	0,23	0,71	0,62

Comme on le voit, le pois fournit des chiffres différents des deux autres plantes, lesquelles donnent au contraire des résultats à peu près de même ordre.

Considérons d'abord les rapports $_2$; ils résultent de deux actions bien distinctes : celle des cotylédons et celle de la plan-

1. Duclaux, *Traité de Microbiologie*, t. III, p. 346. Masson, Paris.

TABLEAU IX

		Maïs.				*Arachide.*			
		1		2		3		4	
		Graines germées.	Albumen et scutellum.	Graines germées.	Albumen scutellum.	Graines germées.	Cotylédons.	Graines germées.	Cotylédons.
		—	—	—	—	—	—	—	—
Poids initial des graines...............	Milligr.	3666,5	3666,5	3429,9	3249,9	4415,5	4415,5	4430	4430
Durée de l'expérience.............. ...	Jours.	6	6	6	6	14	14	16	16
Poids des plantules.....................	Milligr.	438,4	»	412,4	»	242	»	360,2	»
Poids des cotylédons....................	—	2896	»	2717	»	3989	»	3676	»
Extrait sec dans l'eau de germination...	—	54,4	»	30,1	»	120,4	»	465,7	»
CO^2 dégagé	—	443,2	116,9	383	123,4	395,8	183,8	427,6	201,3
Différence CO^2 graines — CO^2 cotylédons.	—	+296,3	»	+259,6	»	+212	»	+226,1	»
Rapport$_1$ $\frac{CO^2 \text{ graines}}{\text{Plantules}}$		0,94	»	0,93	»	1,63	»	1,18	»
Rapport$_2$ $\frac{\text{Diff. } CO^2}{\text{Plantules}}$		0,71	»	0,63	»	0,87	»	0,62	»

tule ; si les cotylédons poussent la digestion des réserves assez loin, de façon a fournir à la plantule une fraction importante des aliments à l'état d'alcool, il s'éliminera dans ces organes une grande quantité de CO^2, la plantule en libérera d'autant moins ; la valeur du rapport $_2$ sera faible ; c'est ce qui se produit chez le pois.

Si, au contraire, les aliments ternaires sont simplement hydrolisés dans les organes de réserve, l'élimination d'acide carbonique se fera de préférence dans les plantules ; le rapport $_2$ sera élevé ; le maïs en fournit l'exemple ; il en est de même chez l'arachide.

Ce résultat se trouve exprimé sous une autre forme dans le tableau I ; on a vu en effet que les pois submergés fabriquent beaucoup d'alcool ; le maïs et l'arachide placés dans les mêmes conditions en donnent au contraire très peu.

J'ai fait remarquer que cela tenait en partie à la nature des réserves ; mais il est probable que la nature de la graine y joue aussi un certain rôle. Tout se passe chez le pois comme si la graine s'approvisionnait en diastases sur la plante mère au cours de la maturation.

Elle conserve cet héritage plus ou moins intégralement jusqu'au moment de la germination, et c'est pour cela que le pouvoir germinatif va en s'affaiblissant avec la durée de la conservation de la graine.

D'une manière générale, toutes les semences sont pourvues d'une certaine quantité de diastases empruntées à la plante mère. MM. Brown et Morris[1] ont montré que la richesse des organes verts des plantes en diastases varie dans des limites très étendues, et précisément c'est le pois qui vient, et de beaucoup, au premier rang, dans la liste assez longue de plantes qu'ils ont observées ; les graminées sont moins riches que les légumineuses.

C'est probablement à cette particularité qu'il faut rattacher les variations que j'ai observées dans la production d'alcool par les graines submergées, car il n'y a aucune raison d'admettre que la zymase ne suive pas les mêmes lois que l'amylase ; mais il n'y a que les apparences qui plaident en faveur de ce rapprochement, c'est une question à étudier.

1. *Journal of the Ch. S.*, mai 1893.

Je dois enfin faire observer que les valeurs trouvées pour les rapports $_2$ ne sont qu'approximatives, elles ne peuvent être exactes qu'autant que la marche de la digestion dans les cotylédons n'est pas influencée par la plantule, comme cela se présente chez le pois ; mais il est certain que chez l'arachide, dont les cotylédons augmentent considérablement de volume, les phénomènes de digestion qui s'accomplissent dans ces organes changent d'allure à mesure que l'air y circule plus facilement ; c'est d'ailleurs ce que l'on va voir plus loin ; ces modifications ont pour résultat d'augmenter la quantité d'acide carbonique dégagé par les organes de réserve ; j'ai admis également que la présence de la plantule doit activer l'élimination d'acide carbonique dans le scutellum du maïs, les chiffres 0,71 et 0,62 sont donc plus forts que les chiffres réels.

Mais quelles que soient la grandeur et la nature de ces influences, les rapports $_1$ conservent leur valeur.

Ici encore, le pois fournit un résultat différent des deux autres plantes examinées. C'est là un fait que l'on ne peut pas interpréter avec ce que nous savons ; j'ai déjà visé la cause probable de cette différence (p. 205), le moment est venu de vérifier la justesse de cette remarque.

Le poids des plantules ne représente pas seulement le poids des substances vivantes fabriquées aux dépens des matériaux empruntés aux organes de réserves, il comprend encore un certain nombre de composés alimentaires tels que les sucres et l'amidon transitoire qui n'ont pas subi de transformations assez avancées pour donner naissance à de l'acide carbonique.

L'accumulation de ces substances dans la plantule peut être provoquée par deux causes : l'étendue des transformations qui s'opèrent dans les cotylédons sous l'influence des diastases ; là où il y a dislocation du sucre en alcool et acide carbonique, on doit constater dans les plantules une accumulation peu abondante d'aliments non transformés ; mais s'il y a simplement hydrolise des matières amylacées, la plantule reçoit une plus grande quantité de sucres et de dextrine, et par conséquent peut en faire de nouvelles réserves si toutefois la consommation n'est pas trop considérable ; il est clair, en effet, que la vitesse relative de la consommation constitue la deuxième cause de variation dans la quantité d'aliments transitoires susceptibles de se déposer dans la plantule.

J'ai évalué, en conséquence, la quantité de sucres et de matières saccharifiables obtenue en soumettant les tiges de pois, de maïs et d'arachides pulvérisés à l'action de l'acide sulfurique à 2 0/0 à la température de 120° pendant 20 minutes.

Les matières réductrices ont été dosées par le procédé Lehmann modifié par Maquenne et évaluées en glucoses ; c'est cette méthode que j'ai toujours employée dans le cours de ce travail.

La germination a été réalisée à la température de 29-30°, à l'étuve obscure ; les graines étaient placées dans du sable mouillé avec de l'eau distillée.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XI

	Durée de la germination.	Sucres et matières saccharifiables 0/0 de poids sec des plantules.
Maïs	5 jours	27,72
Arachide	6 —	15,92
Pois	6 —	14,41

J'ai fait, en outre, un examen plus détaillé de l'accumulation des hydrates de carbone non utilisés dans les plantules d'arachide, suivant la marche de la germination.

Les graines ont été préalablement stérilisées et placées séparément dans des tubes sur du coton plongeant dans l'eau distillée.

On a fait deux lots des plantules qui ont été soumises en entier, tiges et racines, à la saccharification. Le premier lot comprenait les plantules qui avaient très bien poussé. Le deuxième, celles qui avaient assez bien germé.

L'examen du tableau suivant montre que, dans ces conditions, la richesse des plantules en sucres est variable.

TABLEAU XII

Lots.	Durée de la germination.	Poids moyen des plantules.	Sucres et matières saccharifiables 0/0	
			Dans les cotylédons.	Dans les plantules.
	Jours.	Milligr.		
1	14	98,1	13,71	16,67
2	id.	57,7	10,75	21,10
Autre lot, pris avec les tiges seulement.				
3	12	»	»	25,48

Ainsi, bien qu'on n'ait pas tenu compte des matières grasses déposées dans la tige, lesquelles émigrent aussi en nature des cotylédons dans cet organe, l'excédent de sucres et matières saccharifiables dans le maïs et l'arachide montre que c'est bien

à la variation de ces produits, suivant les espèces végétales, qu'il faut attribuer les différences observées dans les valeurs des rapports $_1$.

On est donc autorisé à répondre à la première des questions posées, p. 209, qu'il n'existe chez ces différentes espèces de graines qu'un mode d'utilisation des réserves ternaires, puisque la fabrication de l'unité de poids de plantule entraîne un déchet de carbone à peu près constant à l'état d'acide carbonique.

Et si l'on remonte aux conclusions formulées. p. 215, sur les relations qui existent entre la vie végétative du pois et sa vie fermentative, on est fondé également à généraliser cette notion et à dire qu'un végétal quelconque transforme et utilise ses aliments suivant une loi générale, toujours la même, quelles que soient les conditions de milieu qu'on lui impose. Si on observe l'arrêt du développement de la plantule, ce n'est pas parce que les fonctions de la plante ont été déviées de leur voie normale, c'est parce qu'on a supprimé un des rouages du mécanisme, tel un chronomètre qui ne marque plus l'heure parce qu'on en a retranché une roue.

V

Il s'agit maintenant d'examiner la deuxième question posée (p. 209). J'ai déjà fait remarquer que la transformation des matières grasses en sucres est admise par tous les physiologistes ; et j'ai exposé en quelques mots quelles sont les raisons qui plaident en faveur de cette conception. Mais, comme je l'ai dit aussi, à part la démonstration faite par M. Maquenne sur le ricin, il n'existe aucune preuve directe de cette transformation. On a suivi les modifications chimiques qui interviennent dans les substances oléagineuses pendant le cours de la germination ; mais on n'a pas dégagé d'une façon assez nette les relations qui lient la présence des hydrates de carbone aux mutations survenues dans les différentes catégories d'aliments, pour faire la part exacte des matières grasses.

Les matières azotées de réserves sont certainement capables de former plus ou moins directement une certaine quantité de substances hydrocarbonées pendant le cours de la germination ; mais on ignore la proportion de sucres qui dérive de ces

composés, de même qu'on ne sait rien du sort réservé à la glycérine mise en liberté par la saponification des huiles; on peut supposer comme M. Maquenne qu'elle donne naissance à des glucoses, ou tout au moins à des substances capables de réduire la liqueur de Fehling; il faut donc en tenir compte aussi; mais les produits susceptibles de se transformer en sucres pendant le travail de la digestion, ce sont les hydrates de carbone plus ou moins polymérisés que les semences renferment toujours en plus ou moins grande abondance. On peut se renseigner sur la proportion de sucres provenant de cette source, dans les graines en voie de germination; mais si on en trouve un excédent dont on ignore l'origine, on n'aura le droit de les rapporter aux huiles qu'autant qu'on sera certain que les matières azotées et la glycérine n'ont pas suffi à leur donner naissance.

Le principe de toute méthode destinée à établir la transformation des matières grasses en sucres consiste donc à mettre en évidence la présence d'une quantité telle d'hydrates de carbone, à un moment quelconque de l'évolution de la graine, qu'on ne puisse les attribuer en totalité aux modifications subies par les aliments de réserve, à l'exclusion des substances oléagineuses.

L'expérience réussit très bien avec le ricin, mais elle échoue avec les graines à réserves cotylédonaires si on se contente d'examiner à des époques plus ou moins espacées l'accumulation des hydrates de carbone dans les cotylédons et les plantules pendant le cours de la germination. Si on cherche à interpréter ces résultats, on voit tout de suite qu'on peut les rapporter à plusieurs causes.

L'acide ricinoléique, qui constitue la presque totalité des réserves du ricin, est un acide alcool incomplet présentant un groupement allylique et en conséquence plus facilement oxydable que les acides oléiques ou saturés qui se rencontrent dans les autres graines oléagineuses.

Mais si d'un autre côté, on étudie la physiologie de la germination avec différentes espèces de graines oléagineuses, ricin, arachide, courge, crucifères, etc..., on constate que la valeur du quotient respiratoire, la production de substances vivantes aux dépens d'un poids donné de réserves oléagineuses ne conduisent pas à assigner au ricin une place à part parmi les semences riches en huiles.

On doit donc se demander aussi si l'anatomie de la graine de ricin n'est pas favorable à l'accumulation des produits de transformation des huiles dans les feuilles cotylédonaires et dans la tige de la plantule.

Le ricin, je l'ai dit, possède un organe de réserves, le périperme indépendant de l'embryon qu'il recouvre de toutes parts. Le périsperme du ricin, comme l'endosperme des graminées, est un organe inerte; ce qui tend à le prouver, c'est l'impossibilité de faire germer le ricin dans les conditions exposées (p. 208), car si les cellules du périsperme jouaient un rôle actif dans la digestion des réserves, on aurait pu en constater les effets dans le cours de ces essais.

Il faut donc admettre que l'embryon seul produit les diastases digestives; celles-ci passent par diffusion dans le tissu de réserves où elles agissent sur les aliments. Cette disposition anatomique doit avoir pour conséquence une sécrétion abondante de diastases et une transformation rapide des matériaux de réserves, exactement comme dans les graminées. Si la consommation des sucres marche plus lentement que la production, ces composés s'accumuleront dans les différents organes de la plante; c'est ce qui se produit.

Dans l'arachide, les cellules cotylédonaires sécrètent des diastases et agissent sur leur contenu indépendamment les unes des autres, comme M. Duclaux l'a observé chez d'autres espèces de légumineuses; mais le travail de la digestion est lent et la consommation des sucres semble marcher de pair avec la production. Ces conclusions ont été mises en relief par les recherches de M. Maquenne.

Il en résulte que si l'on veut étendre les conclusions de ce savant relatives à l'acide ricinoléique, aux acides gras en général, il faut provoquer l'accumulation des produits de transformations diastasiques dans les cotylédons, en modérant ou en empêchant la consommation.

Si on fait varier les conditions de la germination, on constate que la richesse en sucres n'est pas comparable d'une condition à l'autre. Les plantes qui ont germé dans du sable sont moins riches que celles qui ont été placées dans des tubes, et parmi celles-ci ce sont en général celles qui germent le moins bien qui présentent le taux de matièrés hydrocarbonées le plu

élevé. V. tableaux XI et XII. Il y aurait peut-être là un moyen détourné d'établir la relation cherchée.

Mais j'ai donné la préférence au procédé suivant : on excise avec un instrument bien tranchant la base de la graine, au-dessus du point d'insertion des cotylédons sur la tigelle, de façon à supprimer l'embryon.

On stérilise les cotylédons ainsi traités et on les place sur des perles de verre et un peu d'eau distillée dans des flacons d'Erlenmeyer qui ont été stérilisées préalablement ; et on expose les cotylédons à la température de 29-30°.

Cette expérience ne fournit pas les résultats cherchés ; je l'ai fait durer des semaines et des mois pour aboutir au même insuccès. La perte par gazéification marche plus vite que le gain par oxydation ; on constate toujours une diminution de poids assez légère cependant. On ne peut pourtant pas admettre que les cellules cotylédonaires ne prennent aucune part à la digestion des huiles dans les conditions où j'ai opéré.

Il faut chercher ailleurs la cause de l'insuccès. Il se peut qu'il soit dû à des mauvaises conditions d'humidité, car les cotylédons placés dans des vases fermés seulement au coton sont exposés à une évaporation trop active, et il faut de temps à autre ajouter de l'eau distillée.

Dans une série d'autres essais, j'ai placé les graines débarrassées de leurs embryons dans un appareil clos, disposé de façon à permettre d'établir à volonté une circulation d'air et à recueillir tout l'acide carbonique dégagé.

Voici les résultats que j'ai obtenus dans ces conditions :

TABLEAU XIII

Matières grasses 0/0 avant l'expérience					53,22
Sucres et matières saccharifiables					14,96
			N° 1.		N° 2.
Poids des cotylédons avant l'expérience			7893 mgr.		6459 mgr.
Poids sec après l'expérience.	Extrait	735,7	8118,7	659	6639
	Cotylédons	7383		5980	
Gain de subst. fixes 0/0 du poids initial			2,85		2,79
Mat. sol. à l'éther sec —			55,37		55,45
Sucres et mat. sacchar. dans les cotylédons 0/0 du poids initial			7,56		6,35
— — dans l'extrait 0/0 du poids initial			manqué		manqué
Acide carbonique dégagé			632 mgr.		534 mgr.
Durée de l'expérience			41 jours		41
Alcool trouvé dans les cotylédons			»		20 mgr.

L'étude de ces chiffres montre que l'expérience ne peut pas fournir de résultats concluants malgré sa durée relativement grande. Le dosage des sucres dans l'extrait a été manqué; mais on voit bien que les quantités qu'on y aurait trouvées n'auraient pas comblé la différence entre 7,56, quantité fournie par les cotylédons, et 14,96, chiffre initial. On voit donc qu'une fraction importante de sucres a dû subvenir au travail de gazéification qui se traduit par un dégagement assez élevé d'acide carbonique.

Il y a eu pourtant une légère augmentation de poïds de substances fixes malgré la perte par gazéification; mais elle se retrouve en grande partie dans les matières grasses qui ont subi un commencement d'oxydation.

Quand on observe les cotylédons après l'expérience, on remarque qu'ils n'ont perdu aucun de leurs caractères extérieurs; ils sont encore cassants et d'un blanc laiteux; la tranche seulement a bruni sur une très faible épaisseur; les grains d'amidon sont plus groupés et peut-être plus nombreux qu'au début.

L'impression qui se dégage de cet examen montre que les cellules cotylédonaires sont restées complètement inaccessibles à l'air, et c'est pour cela que les huiles n'ont subi qu'une légère oxydation; l'absence de plantule a donc exercé ici encore une influence indirecte sur la digestion des réserves en ce sens que les cotylédons ont conservé leur volume primitif; dans les conditions ordinaires de la germination, les cotylédons d'arachide augmentent beaucoup de volume à mesure que la plantule évolue, et on constate également que les faisceaux vasculaires s'élargissent jusque dans leurs plus fines ramifications. Ce sont là des conditions favorables aux phénomènes d'oxydation et qu'il faut remplir.

Pour cela, j'ai fait germer des graines séparément dans des tubes, et au bout de douze jours j'ai pris celles qui avaient le mieux poussé. On en a détaché les cotylédons en sectionnant les pétioles à la base du limbe et on en a fait trois lots; un a été soumis à l'analyse et les deux autres ont été placés en observation dans les mêmes conditions que ceux qui ont servi à l'expérience précédente, en prenant toutefois la précaution de retenir l'alcool dans des barboteurs doubles placés dans la glace fondante.

Toutes ces opérations de germination et de séparation des cotylédons, préliminaires de l'expérience, exigent, comme on le comprend, des précautions minutieuses d'asepsie; les cotylédons détachés des plantules ont été soumis à de nouveaux lavages à l'eau stérile; on a perdu de cette façon une petite quantité de sucres qui a pu diffuser à travers la section des pétioles, car les lavages durent plusieurs minutes; mais on n'en a pas tenu compte.

J'ai consigné dans le tableau ci-dessous les résultats de cette expérience.

TABLEAU XIV

		Lot n° 1.		Lot n° 2.
Poids sec initial des cotylédons..........		2261,3 mgr.		2150,2
Poids final —	2031,2	2615,3	1874,2	2343,6
Extrait dans l'eau distillée (1)...........	584,1		469	
Augmentation 0/0 du poids initial......		15,64		8,77
Mat. solubles dans l'éther av. l'expérience.		46,90 0/0		46,90
— — ap. —		50,156 0/0		49,50
Sucres et matières sacchar. av. l'expér. en glucose.		341,63 mgr.		324,8
— — — ap. l'expér.		468,4		348,8
Gain en sucres et mat. saccharifiables rapporté à 100 du poids initial......		5,60		1,11
Acide carbonique recueilli..............		376,8 mgr.		429,1
Alcool formé (2)........................		0,0		0,0
Durée de l'expérience...............		17 jours		17 j.

Le lot n° 2 fournit des résultats différents du lot n° 1, bien que les deux expériences aient été exécutées simultanément; cela tient au développement d'un bacille, qui a contaminé les cotylédons ; j'ai eu l'occasion de dire dans ce mémoire que les microbes rendent incertains et erronés tous les résultats des expériences faites sur les graines si on ne prend soin d'opérer sur des échantillons préalablement stérilisés ; l'expérience n° 2 vient confirmer cette assertion et montrer quelle est l'importance des actions microbiennes qui s'exercent à côté de celles des plantules ; elle donne une idée des erreurs auxquelles on est exposé lorsqu'on laisse se développer librement, dans ce genre de recherches, moisissures et bactéries.

1. Le poids de l'extrait est élevé parce que les cotylédons ont été soumis, avec le liquide des barboteurs, à la distillation, dans le but de rechercher l'alcool.
2. On n'a pas trouvé d'alcool; l'expérience précédente en avait fourni parce que l'aération des tissus cotylédonaires était insuffisante.

Voyons maintenant quelle est la valeur des arguments fournis par le lot n° 1.

Faisons d'abord remarquer que l'activité vitale des cotylédons se manifeste par le dégagement d'acide carbonique; si on prend comme point de comparaison cette production d'acide carbonique, pour donner une idée de la vitesse des transformations des aliments de réserve dans les cotylédons, tableaux XIII et XIV, on voit qu'elle est deux fois plus grande dans les cotylédons qui ont germé préalablement, et si l'on tient compte du temps, elle est cinq fois plus rapide que dans les cotylédons obtenus en sectionnant la base des graines normales.

Cette activité se traduit, d'autre part, par une prolifération cellulaire qui a son siège dans les portions de pétioles restés adhérents aux cotylédons; ces régions s'allongent beaucoup, et sur quelques-uns des pétioles il se forme des rudiments de folioles; tout cela prouve que la circulation de l'air était assurée dans la masse des organes de réserves. De ce côté par conséquent, le but est atteint.

Les résultats se chiffrent en faveur des sucres et matières saccharifiables par un excédent de 5,60 0/0 du poids de matière soumise à l'expérience.

Dans le bilan, je n'ai pas fait la part des matières cellulosiques ni de la glycérine ni des matières azotées.

D'après les observations de M. Maquenne sur l'arachide, la quantité de cellulose va toujours en augmentant dans les graines en voie de germination; ici nous pouvons la considérer comme constante, bien que l'on ait observé une prolifération cellulaire.

Quant à la glycérine, on admet généralement qu'elle se transforme en sucres chez les végétaux supérieurs; on cite à l'appui de cette assertion la formation d'amidon dans les feuilles dont les pétioles plongent dans une solution de glycérine; mais, dans l'expérience ci-dessus, les aliments de réserve sont simplement soumis à l'action des diastases digestives; les conditions sont toutes différentes, car l'amidon se dépose dans les feuilles seulement en présence d'un grand excès de l'un des composés susceptibles de lui donner naissance.

Mais en admettant la possibilité d'une transformation synthétique de la glycérine, son rôle dans la genèse des sucres doit être tout à fait effacé dans les conditions où je me suis placé.

Ou bien, en effet, la glycérine produite dès le début de la germination par la saponification des matières grasses est absorbée avant les acides gras en raison de son assimilabilité plus grande, et alors elle a disparu complètement pendant la germination préalable de douze jours qui a précédé l'expérience, ou bien, au contraire, elle est consommée parallèlement aux acides gras et proportionnellement à ceux-ci, et dans ces conditions la fraction qui a pris part aux transformations dont les colydélons ont été le siège, est tout à fait insuffisante pour expliquer l'origine de l'excédent de sucres obtenus.

Restent les matières azotées ; celles-ci renferment, on le sait, des chaînons sucrés; de plus, il est probable qu'elles peuvent donner naissance à des matières saccharifiables, non pas pendant le travail de la digestion, mais au cours des transformations que les cellules des plantules leur font subir ; j'aurai justement l'occasion de préciser ce point dans le mémoire suivant ; mais ici on peut faire observer, comme pour la glycérine, que les matières azotées sont simplement soumises à un travail de dédoublement diastasique accompagné de phénomènes d'oxydation, et que la quantité de matières azotées intéressées dans l'expérience ne peut pas fournir une proportion aussi considérable de sucres. On ne peut donc rattacher leur formation, au moins pour la plus grande partie, qu'aux matières grasses, et plus exactement aux acides gras.

Je dois enfin faire remarquer que l'expérience n'a duré que dix-sept jours; on aurait pu tripler cette durée et rien ne permet de supposer qu'on n'aurait pas pu doubler la quantité de sucres en excédent.

Je n'ai pas non plus tiré parti de la quantité de sucres qui a été gazéifiée dans le cours de cette expérience; or, tous les faits relatés dans ce mémoire, concernant la production d'acide carbonique dans les cotylédons, montrent que ce composé provient presque en totalité du dédoublement du sucre en alcool et acide carbonique.

En admettant que la moitié seulement de l'acide carbonique dégagé provienne de ce dédoublement, on est certain de se trouver au-dessous de la réalité; mais cela suffit pour doubler l'excédent de sucres obtenu, et doubler aussi, à peu de chose près, la quantité initiale de sucres et matières saccharifiables que

renfermaient les cotylédons. Pour traduire les faits par des chiffres, on aurait exactement, après l'expérience, 26,4 0/0 du poids initial en sucres et matières saccharifiables, contre 15,09 au début, ce qui fait un excédent de 11,31 0/0.

On constate également une augmentation sensible de matières grasses, exactement 3,25 0/0; ceci n'a rien qui doive nous surprendre. Les huiles exposées à l'air, à une température de 30°, fixent plus ou moins d'oxygène et augmentent par conséquent de poids; les matières grasses émulsionnées des cellules cotylédonaires réunissent toutes les conditions favorables à l'oxydation énergique suivant un processus purement chimique. On peut cependant faire remarquer que l'influence de la cellule vivante, ou mieux des diastases qu'elle met en œuvre, se traduit précisément par une exaltation très accentuée des phénomènes d'oxydation capables de s'accomplir lentement en dehors de leur intervention.

C'est évidemment ce qui se produit dans les graines oléagineuses; et ce qui distingue le processus diastasique du processus chimique, c'est que le premier, tout en exaltant le phénomène, l'oriente, en même temps, vers un but défini, lequel est ici la formation des sucres. On ne constate pas seulement une augmentation de poids des matières solubles à l'éther, on observe aussi une transformation graduelle de ces composés qui les rend peu à peu solubles dans l'eau, alors même qu'ils ne sont pas encore susceptibles d'être caractérisés comme sucres.

Ce qui le prouve, c'est que l'augmentation de poids des matières grasses ajoutée à l'excédent des sucres et matières saccharifiables ne représente que 8,85 0/0 du poids initial, tandis que le gain total atteint 15,64 0/0.

La différence doit être attribuée aux composés intermédiaires solubles dans l'eau qui forment une partie de l'extrait, car cette augmentation de poids ne peut être rattachée à aucune des autres catégories de substances de réserves, puisque l'acide carbonique et l'eau résultant de la combustion respiratoire ne sont pas considérés dans cette augmentation de poids.

On peut donc affirmer que l'assimilation des huiles par les graines en voie de germination exige leur transformation préalable en sucres, lesquels sont ensuite dédoublés en alcool et acide carbonique; aucune des observations faites dans le cours

de ce mémoire ne vient infirmer cette double conclusion, et toutes tendent à l'appuyer dans la mesure où la complexité des transformations qui se passent dans les cotylédons et les plantules permet de démêler les résultats.

CONCLUSIONS

Les conclusions que j'ai tirées des différentes expériences que j'ai rapportées dans ce mémoire ont été exposées à leur place; je n'y reviendrai pas. Je me contenterai de faire observer que les réserves hydrocarbonées ou oléagineuses sont utilisées par la plantule à la suite d'une série de transformations qui aboutissent à un même composé : l'alcool.

On doit se demander si c'est là le terme final auquel aboutit le carbone ternaire avant d'être combiné aux aliments azotés et soumis aux transformations progressives qui aboutissent à la substance vivante. J'ai déjà avancé que l'alcool est probablement oxydé et transformé en aldéhyde éthylique plus apte à contracter avec les noyaux quaternaires des combinaisons multiples; mais le moment n'est pas encore venu de traiter ce point.

A côté de cette question, il y en a une autre qui se pose tout naturellement : n'existe-t-il qu'un mode unique d'utilisation du carbone ternaire chez les végétaux supérieurs? Il est probable qu'il y en a plusieurs. Mais avant de se procurer les moyens de les mettre en evidence, il était indispensable de se renseigner sur celui qui paraît prédominer.

Cependant, il y en a un qui semble tellement évident qu'il est impossible, en apparence, d'élever le moindre doute sur son existence. C'est la transformation des sucres en cellulose, ou plus exactement en substances polymères des sucres en C^6 et C^5 susceptibles de se dédoubler en leurs constituants sous l'influence des acides bouillants.

La membrane cellulosique est une partie intégrante de la cellule végétale, et, pour cette raison, le mode de formation des celluloses constitue un processus d'assimilation, au même titre que celui qui préside à l'incorporation du carbone ternaire à la substance vivante. Mais la conception qui admet qu'elles dérivent de la condensation des sucres n'est pas générale. M. Laborde[1] a

1. Ces *Annales*, 1897, p. 1.

montré que l'*Eurotyopsis Gayoni*, qui se développe sur un milieu minéral ne renfermant que de l'alcool éthylique, ou de l'acide lactique, etc..., comme aliment organique utilisable, fabrique sa membrane cellulosique avec la même facilité apparente que s'il avait du sucre à sa disposition.

On peut faire observer qu'il commence d'abord par fabriquer ce sucre qui lui manque pour en faire ensuite des substances cellulosiques. C'est sur ce point que j'aurai quelques observations à présenter dans le mémoire suivant.

En terminant, je ferai remarquer enfin que tous les résultats acquis sur l'assimilation chez les graines en voie de germination sont applicables à la plante adulte; celle-ci ne diffère de la plantule qu'en ce qu'elle fabrique elle-même ses aliments hydrocarbonés par la synthèse chlorophyllienne, et qu'elle tire son azote des nitrates et de l'ammoniaque du sol.

Construite aux dépens de l'azote minéral et des hydrates de carbone, la plante adulte doit présenter une composition telle que l'hydrogène et l'oxygène s'y trouvent dans la même proportion que dans l'eau, puisque le quotient respiratoire montre qu'il y a à peu près autant d'oxygène emprunté à l'atmosphère qu'éliminé à l'état de gaz carbonique.

Or, on sait qu'il n'en est pas ainsi; la composition moyenne montre qu'il y a plus d'hydrogène que n'en indique cette hypothèse. Le mode d'utilisation du carbone ternaire, exposé p. 215, rend parfaitement compte de ce résultat. Les observations de M. Müntz (*loc. cit.*), de M. Berthelot[1], de M. Devaux[2], sur la présence de l'alcool dans les végétaux supérieurs, viennent également à l'appui de mes conclusions. J'aurais pu essayer de vérifier ce fait comme conclusion de mes recherches sur les plantules de pois, par exemple, en les soumettant à l'analyse élémentaire; mais les chiffres n'auraient pas présenté la netteté voulue à cause de la présence d'une grande quantité d'aliments non transformés, et aussi à cause de l'intervention des composés azotés qui, tout en changeant de nature, se modifient peu au point de vue de leur composition.

1. *C. R.*, loc. cit.
2. *C. R.*, t. CXXVIII, p. 1347.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

16me ANNÉE AVRIL 1902 No 4

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ANÉMIE EXPÉRIMENTALE

ÉTAT DE LA CYTASE HÉMOLYTIQUE

DANS LE PLASMA DES ANIMAUX NORMAUX

PAR C. LEVADITI (DE BUCHAREST).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

PLANCHE III ET IV

Dans un mémoire publié récemment dans ces *Annales*[1], nous avons exposé les résultats de nos recherches sur l'état de la *cytase bactériolytique* (*complément*, *alexine*), dans le plasma des animaux normaux et des organismes vaccinés contre le vibrion cholérique. Ces recherches nous ont permis de conclure que ce composant des sérums bactéricides que l'on appelle cytase, et que l'on envisage comme un principe éminemment labile et dépourvu de spécificité, n'existe pas à l'état de liberté dans le plasma, mais qu'il est renfermé dans ses générateurs, les phagocytes. Toute atteinte portée à la vitalité de ces phagocytes, tend à extérioriser la cytase et permet ainsi au deuxième composant spécifique des humeurs microbicides, la *sensibilisatrice* (*Immunkörper*, *Zwischenkörper*) de réaliser la destruction extracellulaire des infiniment petits.

Nos expériences étant exclusivement limitées à l'étude de la bactériolyse, nous nous sommes gardé d'affirmer quoi que ce soit de précis au sujet de l'état où se trouve le *cytase cytolytique* dans le plasma des animaux normaux ou immunisés. Nous

1. *Sur l'état de la cytase dans le plasma des animaux normaux et des organismes vaccinés contre le vibrion cholérique.* Ces *Annales*, 1901.

n'avons établi que des analogies lointaines entre ces deux espèces de cytase, pénétré que nous étions de la notion de la pluralité des alexines. Plusieurs faits, en particulier ceux fournis par les analyses quantitatives d'Ehrlich et Morgenroth [1], et les observations de Metchnikoff [2] et Tarasséwitch [3] concernant la distinction que l'on doit faire entre la *microcytase* (aléxine bactériolytique) et la *macrocytase* (alexine cytolytique), nous mettaient en garde contre toute conclusion prématurée. Il est vrai que les constatations récentes de Bordet et Gengou [4], montrant que les érytrocytes sensibilisés au moyen d'une hémolysine spécifique, sont capables de débarrasser un sérum neuf de la totalité des cytases qu'il renferme, semblaient venir à l'appui de la conception unitaire de l'alexine. Néanmoins, étant donné que le phénomène décrit par ces auteurs pourrait s'expliquer en admettant que les érytrocytes sensibilisés ou les produits de l'hémolyse (les stromas) fixent d'une manière non élective la cytase bactériolytique, nous avons persisté à accepter la notion de la pluralité des cytases, et nous avons limité nos conclusions exclusivement au complément bactériolytique. — Nous avons cité dans ce mémoire les recherches récentes de M. Rehns [5], d'après lesquelles il résulte que la cytase hémolytique circule à l'état de liberté dans le plasma, et nous avons montré les objections qu'on pourrait adresser à ces recherches.

Depuis la publication de notre travail, M. Max Gruber a repris la question de l'état de la cytase hémolytique dans le plasma [6]. Les expériences que cet auteur a entreprises à ce sujet, et qui lui semblent ne pouvoir être atteintes par « aucune objection », l'ont amené à conclure que « *das Alexin* (*cytase*) *ein Erzeugniss des lebenden Organismus ist, und bereits im normalen Blutplasma circulirt* [7] ». Les résultats de ces expériences, qui, d'après le savant viennois, sont destinées à trancher d'une manière défi-

1. Ehrlich et Morgenroth, *Ueber Hæmolysine*, 5e mémoire, *Berl. kl. Woch.*, 1901.
2. Metchnikoff, *L'Immunité dans les maladies infectieuses*, Paris, Masson, 1901.
3. Tarasséwitch, Sur les cytases. Ces *Annales*, vol. XVI, nº 2, 1902.
4. Bordet et Gengou, ces *Annales*, 1901.
5. Rehns. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1901.
6. M. Gruber, *Zur Theorie der Antikörper*, 2e partie, *Ueber Bakteriolyse u. Hæmolyse.* (*Münch. med. Woch.*, 1901, nos 46-49.)
7. Depuis lors, M. Gruber a émis une opinion sensiblement différente. Il n'affirme plus avec la même certitude que la cytase circule à l'état libre dans le plasma des animaux normaux et se demande si cette cytase n'est pas sécrétée par l'organisme, sous l'influence de l'injection de sérum hémolytique (*Von injicirten Serum ausgeübten Reiz*). (*Wien. kl. Woch.*, 1901, nº 50, p. 1244.)

nitive «*die Iahrzehnte alte Streitfrage*», ont été exposés lors d'une discussion sur la théorie des *chaînes latérales*, de M. Ehrlich, qui a eu lieu à la Société des médecins de Vienne.

A la lecture du travail de M. Gruber, il nous a semblé surprenant que ce qui est vrai pour la cytase bactériolytique, ne le soit pas également pour l'alexine cytolytique. Aussi, avons-nous été déterminé à reprendre les recherches de M. Gruber et à analyser de près les faits qui ont autorisé cet auteur à affirmer que cette cytase cytolytique circule à l'état de liberté dans le plasma. Les résultats des expériences que nous avons entreprises à ce sujet, sont défavorables à l'opinion que M. Gruber se fait du mécanisme qui préside à la destruction des hématies dans l'organisme. Ils nous ont montré que le savant viennois est tombé dans un piège que l'étude des phénomènes complexes de la biologie nous tend trop souvent, et qui consiste à observer le premier et le dernier des phénomènes qui font partie d'un enchaînement de faits, et à combler l'intervalle par toute une série de probabilités.

Examinons rapidement les expériences de M. Gruber. On sait que si l'on chauffe à la température de 55° un sérum hémolytique obtenu en injectant à une espèce animale A des érytrocytes provenant d'une espèce B, on rend ce sérum inactif. Ce sérum, mélangé à des globules rouges fournis par l'espèce animale B, ne dissout plus ces globules, mais, suivant les cas, les agglutine d'une manière plus ou moins intense. Or, on peut rendre à ce sérum, ainsi inactivé, son pouvoir dissolvant primitif : il suffit de lui ajouter une quantité donnée de sérum frais provenant d'un animal neuf, sérum qui à lui seul n'exerce aucune influence hémolytique. Il est admis, depuis les recherches de Bordet, que le sérum normal renferme une *cytase* capable de réactiver la *sensibilisatrice* spécifique, contenue dans le sérum hémolytique chauffé.

M. Gruber se sert dans ses expériences d'un sérum dissolvant pour les hématies du cobaye, sérum qu'il obtient en administrant à des lapins des érytrocytes provenant de cette dernière espèce animale. Ce sérum, préalablement chauffé, peut être réactivé à l'aide d'une quantité donnée de sérum de cobaye neuf. Le sérum fourni par les lapins immunisés renferme donc

une sensibilisatrice capable de se *fixer*, comme l'ont démontré Ehrlich et Morgenroth[1], sur les globules rouges du cobaye; d'autre part, le sérum de cobaye neuf contient une cytase ayant la propriété de réactiver cette sensibilisatrice.

La question est de savoir dans quel état (libre ou fixe) se trouve cette cytase dans l'*organisme vivant*; car, il ne faut pas l'oublier, les données concernant les propriétés de ces sérums résultent exclusivement des expériences faites *in vitro*. Pour élucider cette question, M. Gruber injecte dans le péritoine des cobayes neufs une quantité donnée (4 à 10 c. c.) de sérum hémolytique, préalablement inactivé à 55°. La masse injectée est rapidement résorbée et passe dans la circulation générale. Le résultat final de l'expérience dépend de la présence ou de l'absence de cytase libre dans le plasma. En effet, si cette cytase existe effectivement comme unité agissante dans ce plasma, elle doit forcément réactiver la sensibilisatrice qui abandonne la cavité péritonéale et permettre à cette sensibilisatrice de dissoudre les globules rouges circulants. Dans ce cas, l'injection de sérum hémolytique inactivé sera suivie d'une anémie prononcée et d'une hémoglobinurie plus ou moins accentuée. Rien de tout cela n'aura lieu, si le plasma ne renferme pas de cytase libre.

Or, l'expérience vient entièrement à l'appui de la première de ces alternatives. *Les cobayes qui reçoivent dans leur péritoine le sérum hémolytique inactivé, offrent, après une augmentation passagère du nombre des globules rouges, une anémie de plus en plus profonde, en même temps qu'une hémoglobinurie accentuée. De là, la conclusion que la cytase existe à l'état de liberté dans le plasma.*

On pourrait considérer cette conclusion comme étant juste, si l'on démontrait préalablement :

1° *Que la réactivation du sérum hémolytique n'a pas lieu déjà dans la cavité péritonéale ; ou, si cela est ainsi, que cette réactivation s'opère au moyen d'une cytase préexistante dans cette cavité, et non pas mise en liberté au moment même où l'on pratique l'injection;*

2° *Que si la réactivation ne s'effectue pas déjà dans le péritoine, ou si elle ne s'effectue que partiellement, elle a réellement lieu dans la circulation générale;*

1. Ehrlich et Morgenroth, *Ueber Hæmolysine*. 1er mémoire. *Berl. kl. Woch.*, 1899. N° 1.

3° *Que l'anémie et l'hémoglobinurie que l'on observe chez ces animaux sont réellement dues à l'action combinée de la sensibilisatrice injectée et d'une cytase existant dans le plasma, et qu'aucun autre facteur n'intervient pour déterminer la destruction des globules rouges.*

Le premier et le troisième des *desiderata* qui découlent de la conception de M. Gruber peuvent être soumis au contrôle de l'observation directe. Il n'en est pas de même du second. En effet, il est extrêmement difficile de poursuivre la sensibilisatrice dans le chemin qu'elle parcourt entre sa porte d'entrée le péritoine et son point d'arrivée, encore non précisé. On peut pourtant détourner cet obstacle, si l'on a soin d'envisager la question à un point de vue différent.

La sensibilisatrice introduite dans la cavité péritonéale abandonne cette cavité et pénètre dans le torrent circulatoire, soit directement, soit indirectement, en suivant la voie lymphatique. Là, elle rencontre les globules rouges flottant dans le plasma, globules pour lesquels, comme l'ont démontré Ehrlich et Morgenroth, cette sensibilisatrice possède une affinité spécifique, et sur lesquels elle se fixe rapidement, soit en entier, soit en partie. Dans ce dernier cas, il est *a priori* concevable qu'il puisse s'opérer une répartition de la sensibilisatrice entre les érytrocytes et le plasma, répartition qui dépend de la quantité d'hémolysine qui existe à un moment donné dans le torrent circulatoire. Des globules sensibilisés peuvent par conséquent se trouver, à une période déterminée de l'expérience, en présence d'un plasma renfermant de la sensibilisatrice. Or, si dans ce plasma, la cytase cytolytique circule librement, cette cytase ne doit pas tarder à réactiver la sensibilisatrice fixée sur les globules rouges et déterminer la dissolution de ces globules. La sortie de l'hémoglobine sera ainsi réalisée et le plasma prendra une couleur rouge plus ou moins intense.

Dans l'hypothèse de la liberté de la cytase, on peut par conséquent rencontrer à un moment donné dans le torrent circulatoire, une des trois combinaisons suivantes :

1° *Plasma hémoglobinifère, renfermant de la sensibilisatrice + globules rouges sensibilisés ;*

2° *Plasma hémoglobinifère, renfermant de la sensibilisatrice + globules rouges non sensibilisés ;*

3° *Plasma hémoglobinifère, dépourvu de sensibilisatrice + globules rouges non sensibilisés.*

Dans le premier cas, il y a eu excès de sensibilisatrice et dissolution incomplète des globules sensibilisés, ce qui peut être dû à une insuffisance de cytase. Dans le second cas, il y a eu excès de sensibilisatrice et dissolution complète des globules sensibilisés. Enfin, dans le troisième cas, toute la sensibilisatrice présente, à un moment donné, dans le torrent circulatoire a été utilisée pour la sensibilisation des globules rouges, qui, étant donné un excès de cytase libre, se sont entièrement dissous.

Mais *la seule combinaison incompatible avec l'hypothèse de la liberté de la cytase hémolytique*, est la suivante :

Plasma INCOLORE, *renfermant de la sensibilisatrice + hématies sensibilisées.*

Il est, en effet, impossible de concevoir comment, à la température du corps, des érytrocytes sensibilisés peuvent exister dans un plasma qui renferme, en plus de la sensibilisatrice, DE LA CYTASE LIBRE, *sans se dissoudre et répandre leur hémoglobine dans ce plasma.*

Il s'agit donc de rechercher si une telle combinaison existe réellement dans les expériences de M. Gruber. S'il en est ainsi, ces expériences perdent toute leur valeur démonstrative, et l'hypothèse de la liberté de la cytase hémolytique dans le plasma des animaux neufs, devient une simple vue de l'esprit.

Nous avons analysé chez nos cobayes, ce qui se passe dans la cavité péritonéale, dans la circulation générale et à l'intérieur des organes. Disons-le tout de suite, les conclusions auxquelles nous sommes arrivé confirment sur beaucoup de points les faits annoncés par M. Savtchenko[1] dans un travail paru récemment dans ces *Annales*. Nous avons pris connaissance de ce travail au cours de nos recherches sur la cytase hémolytique, et nous sommes arrivés, indépendamment de ce savant, à des résultats analogues. Le lecteur trouvera dans le présent mémoire la confirmation des observations, ainsi que la critique de certaines expériences de M. Savtchenko.

1. SAVTCHENKO. Du rôle des immunisines (fixateurs) dans la phagocytose. Ces *Annales*, vol. XVI, fasc. 2.

I

LES PHÉNOMÈNES QUI ONT LIEU DANS LA CAVITÉ PÉRITONÉALE

La cavité péritonéale du cobaye renferme des leucocytes mononucléaires (macrophages) et polynucléaires (pseudo-éosinophiles et parfois vrais éosinophiles) en quantité variable. Presque constamment le nombre des mononucléaires dépasse celui des polynucléaires ; presque constamment aussi ces derniers figurent dans le tableau leucocytaire de la lymphe péritonéale de ces cobayes. Il est donc inexact d'affirmer, comme le fait M. Gruber, que cette lymphe est, pour ainsi dire, complètement dépourvue de polynucléaires.

Lorsqu'on introduit dans le péritoine d'un cobaye neuf, de 6 à 7 c. c. de sérum hémolytique pour les globules rouges de cet animal, sérum qui a été préalablement inactivé, on provoque presque toujours une légère hémorragie. On constate alors les modifications suivantes :

1° La plupart des globules blancs de la lymphe péritonéale ne tardent pas à s'agglutiner et à disparaître. Le liquide retiré ne renferme que de très rares amas de leucocytes, dont on peut souvent constater l'état de souffrance, si l'on se rapporte à l'état granuleux de leur protoplasma ;

2° Les érytrocytes s'agglutinent instantanément et subissent, dès la première demi-heure, une dissolution plus ou moins accentuée. Cette dissolution se traduit par la couleur rosâtre du liquide retiré du péritoine, et par la présence de gros paquets de globules rouges qui laissent échapper leur hémoglobine. Elle peut être observée directement, si l'on a soin de maintenir ce liquide, en goutte pendante, à la température de 38°. Après quelques minutes, ces amas de globules rouges ne sont plus que des stromas incolores ;

3° Quelques rares leucocytes mono-nucléaires englobent une ou deux hématies. Cette érytrophagocytose est extrêmement discrète et manque le plus souvent ;

4° Une ou deux heures après l'injection, on constate une nouvelle arrivée de globules blancs, pour la plupart polynucléaires, ainsi que de nouveaux globules rouges. *Les hématies nouvellement déversées dans la cavité péritonéale s'agglutinent, mais ne*

subissent pas de dissolution. L'érytrophagocytose est presque nulle ;

5° Enfin, entre la 12me et la 40me heure, l'arrivée des macrophages, la phagocytose des leucocytes polynucléaires par ces macrophages et la résorption plus ou moins complète de l'exsudat, mettent fin au processus qui se déroule dans le péritoine de ces cobayes neufs.

Il en est de même si, au lieu d'injecter à ces cobayes le sérum hémolytique seul, on a soin d'ajouter préalablement à ce sérum quelques gouttes de sang de cobaye, débarrassé de cytase au moyen de lavages répétés. Ces globules, déjà agglutinés, se dissolvent rapidement ; leur transformation dans des stromas incolores accompagne la disparition des leucocytes de la lymphe péritonéale.

Nous conclurons de ces faits que *la sensibilisatrice introduite dans le péritoine des cobayes neufs ne tarde pas à se réactiver, grâce à la cytase qu'elle rencontre à un moment donné dans ce péritoine.* Nous ajouterons que *cette réactivation est partielle*, vu que les globules rouges qui sont déversés dans la cavité péritonéale quelque temps après la dissolution des premiers, sont plus ou moins agglutinés, mais ne montrent pas le phénomène de l'hémolyse. A ce moment la cavité péritonéale renferme une certaine quantité de sensibilisatrice capable d'influencer ces globules rouges, mais, faute de cytase, cette sensibilisatrice n'exerce aucune action dissolvante à l'égard de ces hématies.

Que la dissolution des érytrocytes s'opère grâce à la cytase, c'est ce que l'expérience suivante montre clairement :

Expérience A. Deux cobayes *A* et *B*, de même poids (480 gr.) sont traités comme suit :

A reçoit dans la cavité péritonéale un mélange constitué de 4 c. c. de sérum hémolytique chauffé + 4 c. c. d'*anticytase*[1] (anticomplément obtenu en injectant à des lapins du sérum de cobaye neuf.) + 5 gouttes de sang de cobaye débarrassé de cytase.

B recoit dans la même cavité un mélange formé de 4 c. c. de sérum hémolytique inactivé + 4 c. c. de sérum de *lapin normal* + 5 gouttes de sang de cobaye, également débarrassé de cytase.

Une demi-heure après l'injection, on constate que les hématies injectées à l'animal *A* persistent à l'état agglutiné dans la cavité péritonéale, sans

1. Le sérum anticytasique, ainsi que le sérum de lapin neuf, ont été préalablement inactivés.

subir aucune dissolution, tandis que les érytrocytes introduits dans le péritoine de l'animal *B* sont rapidement et totalement dissous[1].

Il résulte de cette expérience qu'*il suffit de neutraliser au moyen d'une dose convenable d'anticytase, la cytase qui se trouve à un moment donné dans la cavité péritonéale, pour empêcher complètement la dissolution des globules rouges introduits en même temps que la sensibilisatrice, dans cette cavité.* L'hémolyse constatée dans l'expérience décrite plus haut est donc réellement due à l'intervention d'une certaine quantité de cytase libre. Il s'agit de préciser si cette cytase préexiste dans le péritoine, ou bien si elle est mise en liberté par les leucocytes qui flottent dans la lymphe péritonéale normale, leucocytes qui sont atteints dans leur vitalité par l'injection trop brusque d'un liquide dont la température est inférieure à celle du corps. En d'autres mots, il est indiqué de rechercher *si ce n'est pas la phagolyse provoquée par l'introduction du sérum hémolytique dans la cavité péritonéale, qui est la source de la cytase.*

Rappelons tout d'abord que cette question, posée lors de l'analyse du phénomène de Pfeiffer, a été résolue dans le sens de la non-liberté de la cytase bactériolytique dans la lymphe péritonéale. Metchnikoff et ses élèves ont vu qu'il suffisait de renforcer les leucocytes de cette lymphe au moyen d'une injection préalable de bouillon ou d'eau physiologique, pour entraver la transformation granulaire extra-cellulaire des vibrions cholériques. Ce fait pourrait également exister dans le domaine de la cytase hémolytique.

Les deux objections qui semblent s'opposer à cela peuvent être facilement écartées. En effet, la constatation de Gruber et Durham, à savoir que la diminution du nombre des globules blancs qui suit l'injection de liquides divers dans la cavité péritonéale, n'est pas due à une dissolution de ces globules, mais tout simplement à leur agglutination et à leur déposition sur le péritoine pariétal et l'épiploon, ne prouve rien contre la conception de la phagolyse. On sait qu'il n'est nullement nécessaire que les leucocytes soient *entièrement* « *dissous* », pour qu'ils puissent mettre en liberté les substances que leur protoplasma renferme; il

1. Cette expérience est à rapprocher de celles dont se sert M. Wassermann pour préciser le rôle de la cytase dans l'immunité naturelle et artificielle. (*Z. für Hygiene*, 1901. Vol. 37, f. I.)

suffit qu'ils soient atteints plus ou moins dans leur vitalité, ou impressionnés d'une manière plus ou moins forte. — D'autre part, si l'on se rappelle que la lymphe péritonéale renferme relativement peu de leucocytes polynucléaires, et si l'on se place au point de vue de l'unité de la cytase, on peut objecter avec M. Gruber que la pauvreté de cette lymphe en globules blancs à noyau polymorphe, est peu d'accord avec la mise en liberté d'une quantité suffisante de cette cytase, lors de la phagolyse. Or, d'une part, la réactivation de la sensibilisatrice introduite dans le péritoine est, comme nous l'avons vu, réellement incomplète, et d'autre part, ce ne sont pas les polynucléaires qui engendrent la cytase hémolytique, mais très vraisemblablement les macrophages [1], dont le nombre, dans la lymphe péritonéale, est, de l'avis même de M. Gruber, de beaucoup supérieur à celui des leucocytes polynucléaires.

Quoi qu'il en soit, c'est à l'expérience de répondre à cette question. Les résultats des nombreuses recherches que nous avons entreprises à ce sujet ont été concordants et conformes aux faits avancés par Savtchenko et Tarassévitch. Il suffit de préparer les cobayes à l'aide d'une injection intra-péritonéale de bouillon ou d'eau physiologique [2], pratiquée 18 heures avant l'expérience, pour constater que lorsqu'on introduit dans le péritoine de ces animaux l'hémolysine inactivée, ajoutée ou non de globules rouges, *aucune dissolution extracellulaire n'a lieu*. Au contraire, la phagocytose des hématies est, dans ce cas, très accusée. On voit 3 à 5 heures après l'injection que les macrophages englobent jusqu'à 10 et 12 globules rouges, globules qui ne tardent pas à confluer et à se transformer en masses hémoglobiniques plus ou moins volumineuses (voir planche IV, fig. 1 et 2).

Il résulte de ces recherches que si l'on entrave la phagolyse, en renforçant les globules blancs de la lymphe péritonéale, on empêche la réactivation de la sensibilisatrice injectée. *Cette réactivation devient ainsi une conséquence de la phagolyse; la cytase ne préexiste donc pas à l'état de liberté dans la cavité péritonéale des cobayes neufs.*

Quel est le mécanisme qui préside à la production de cette

1. D'après les recherches de Metchnikoff et de Tarassévitch (*loc. cit.*).
2. Nous appellerons dorénavant les animaux ainsi traités : *cobayes préparés.*

déterioration des globules blancs ? Il est complexe. En effet, il faut, en premier lieu accuser avec Metchnikoff l'action brusque du liquide injecté, liquide qui est à une température inférieure à celle du corps animal. En second lieu, on doit tenir compte *du pouvoir leucolytique spécifique* du sérum hémolytique employé dans ces expériences. Le second de ces mécanismes est une conséquence du premier, il se trouve entièrement sous sa dépendance et concourt avec lui au résultat final.

On sait que, pour obtenir un sérum hémolytique, on administre à une espèce animale *A* le sang débarrassé de sérum, provenant d'une espèce *B*. Or, dans ce sang, à côté des érytrocytes, il existe un nombre plus ou moins considérable de globules blancs. Il résulte que le *sérum ainsi obtenu est non seulement hémolytique, mais aussi leucolytique*. L'expérience la plus simple démontre le pouvoir destructeur que ce sérum exerce sur les leucocytes.

Si l'on met des globules blancs de cobaye, obtenus au moyen d'une injection intra-péritonéale de bouillon ou d'eau physiologique, et soigneusement lavés, en contact d'une part avec une dose déterminée de sérum hémolytique inactivé, d'autre part avec la même dose du sérum provenant d'un lapin neuf, également inactivé, on constate que dans le premier cas les leucocytes sont rapidement agglutinés, tandis que, dans le second, ces leucocytes n'offrent aucune modification appréciable. Le sérum hémolytique renferme par conséquent une agglutinine capable d'agir sur les globules blancs provenant de l'animal pour les érytrocytes duquel ce sérum est dissolvant. Renferme-t-il également une sensibilisatrice ? On peut s'assurer aisément de la présence de cette sensibilisatrice, en ajoutant aux mélanges précédents une trace de sérum frais de cobaye normal. On constate dans ce cas que les leucocytes agglutinés ne tardent pas à montrer des signes de destruction (apparition du noyau, état transparent du protoplasma, etc.), tandis que les globules blancs mis en contact avec le sérum du lapin normal, conservent toute leur intégrité.

Si le sérum inactivé que nous employons dans nos expériences est à la fois hémolytique et leucotoxique, que se passe-t-il lorsque nous introduisons ce sérum dans le péritoine des cobayes neufs ? La sensibilisatrice leucolytique se fixe rapide-

ment sur les globules blancs de la lymphe péritonéale, ou sur un certain nombre de ces globules, et détermine leur agglutination. Mais elle n'agit leucolytiquement qu'à la condition qu'il y ait de la cytase libre, capable de réactiver cette sensibilisatrice. Or, l'injection du liquide, au même titre que l'introduction, dans la cavité péritonéale, de bouillon ou d'eau physiologique, engendre déjà la destruction d'une partie de ces globules blancs et la mise en liberté de la cytase que ces globules blancs renferment. Il résulte qu'effectivement la sensibilisatrice leucotoxique fixée sur les leucocytes est réactivée et que ces leucocytes subissent l'influence dissolvante de notre sérum. Ces cellules succombent et mettent en liberté une nouvelle quantité de cytase, qui se trouve ainsi à la disposition de la sensibilisatrice hémolytique contenue dans le sérum injecté.

On peut conclure de ces faits que la phagolyse intra-péritonéale reconnaît un double mécanisme, *dont le résultat final est la mise en liberté d'une quantité de cytase capable de réactiver, déjà dans le péritoine, une partie de la sensibilisatrice injectée.*

En dehors des phénomèmes déjà complexes que nous avons examinés jusqu'ici, il y a lieu de tenir compte d'un fait nouveau, à savoir *la fixation d'une portion de la sensibilisatrice hémolytique sur les globules blancs de la lymphe péritonéale.* On pensait généralement que les sensibilisatrices spécifiques, telles que l'hémolysine, la leucotoxine, la spermotoxine, etc., n'agissent et ne se *fixent* que sur les éléments cellulaires qui ont servi à la préparation de ces sensibilisatrices. La chose est vraie, mais non pas dans un sens absolu ; il s'agit plutôt d'une répartition quantitative de ces cytotoxines. En effet, nos expériences nous montrent d'une manière évidente que *la sensibilisatrice hémolytique peut se fixer non seulement sur les hématies, mais aussi sur les leucocytes des exsudats et des ganglions lymphatiques, ainsi que sur d'autres éléments cellulaires.* Voici quelques-unes de ces expériences :

Expérience B. — Deux cobayes reçoivent dans le péritoine 10 c. c. de bouillon. Les animaux sont sacrifiés vingt heures après l'injection. On recueille l'exsudat péritonéal, on centrifuge pour séparer les globules blancs et on lave rapidement ces globules à l'eau physiologique. Ces leucocytes sont mis en contact avec 2 c. c. de sérum hémolytique[1] préalablement inactivé. Une quantité de globules rouges de cobaye, correspondante quant

1. Ce sérum a été obtenu en injectant à des lapins, des érytrocytes de cobaye.

SANG de cobaye 5 0/0	CYTASE de cobaye.	EAU physiologique.	SÉRUM hémolytique inactif.	SÉRUM hémolytique + sang.	SÉRUM hémolytique + leucocytes.	
0,5	0,1 c. c.	1,35 c. c.	0,05 c. c. trace.	0,05 c. c. } Nul.	0,05 c. c. } Nul.	
0,5	0,1 —	1,30 —	0,1 — beaucoup.	0,1 —	0,1 —	
0,5	0,1 —	1,20 —	0,2 — complet.	0,2 —	0,2 — trace	
0,5	0,1 —	1,15 —	0,25 — —	0,25 —	0,25 — —	
0,5	0,1 —	1,4 —	0	0	0 nul.	Contrôle.

au volume, à celle des globules blancs, est mise en présence de 2 c. c. du même sérum hémolytique. On laisse séjourner au thermostat pendant deux heures, on centrifuge et on apprécie la teneur en sensibilisatrice hémolytique de ces deux liquides, ainsi que celle du sérum n'ayant subi aucun traitement.

Expérience C. — On recueille 1gr,2 de foie de cobaye, en même temps que 1gr,2 de ganglions de la même espèce animale. Après lavage et trituration, on met les masses cellulaires (qui renferment très peu de globules rouges) en contact avec 40 gouttes d'une hémolysine inactivée. On maintient pendant 2 heures à la température de la chambre, on centrifuge et on apprécie la richesse en sensibilisatrice des liquides décantés.

SANG de cobaye 5 0/0.	CYTASE de lapin.	EAU physiologique.	SÉRUM hémolytique inactif.	SÉRUM hémolytique + glob. rouges.	SÉRUM hémolytique + ganglions.	SÉRUM hémolytique + foie.
1 c. c.	0,2 c. c.	1,35 c. c.	0,05 } Complet.	0,05 } Nul.	0,05 trace.	0,05 trace.
1 —	0,2 —	1,30 —	0,1	0,1	0,1 —	0,1 partiel.
1 —	0,2 —	1,25 —	0,15	0,15	0,15 partiel.	0,15 beaucoup.
1 —	0,2 —	1.20 —	0.2	0,2	0.2 —	0.2 —

Expérience D. — On se sert d'un sérum hémolytique fourni par un cobaye qui a reçu plusieurs injections de sang de bœuf. On met en contact :

40 gouttes de ce sérum *inactivé* avec 0,8 c. c. de sang de bœuf (lavé)
40 — — — — spermatozoïdes de taureau (lavés).
40 — — — — suc ganglionaire de bœuf (lavé)[1]

On maintient pendant trois heures à la glacière et trois heures à la température de la chambre. On centrifuge et on apprécie la teneur en sensibilisatrice.

1. L'examen microscopique montre que ce suc ganglionaire ne renferme que très peu de globules rouges.

SANG de bœuf. 5 0/0	CYTASE de cobaye.	EAU physiologique.	SÉRUM hémolytique.	SÉRUM hémolytique + *sang*.	SÉRUM hémolytique + spermatozoïdes.	SÉRUM hémolytique + suc ganglionaire.
1 c. c.	0,05	1,35	0,005 trace.	0,005	0,005 trace.	0,005
1 c. c.	0,05	1,3	0,01 peu.	0,01	0,01 peu	0,01 *
1 c. c.	0,05	1,2	0,02 p. complet.	0,02	0,02 p. complet.	0,02 NUL
1 c. c.	0,05	1,35	0,05	0,05 NUL	0,05	0,05
1 c. c.	0,05	1,3	0,1	0,1	0,1	0,1
1 c. c.	0,05	1,2	0,2 Complet.	0,2	0,2 Complet.	0,2 trace.
1 c. c.	0,05	1,15	0,25	0,25	0,25	0,25 —

* Pour ces 3 doses, on a dilué le sérum au 1/10e.

Il résulte de ces recherches que *les globules rouges possèdent l'affinité la plus forte vis-à-vis de la sensibilisatrice hémolytique. Viennent par ordre de décroissance le suc ganglionaire, les leucocytes des exsudats et les cellules hépatiques. Les spermatozoïdes ne semblent pas fixer cette sensibilisatrice*[1]. Il résulte également *que lorsque nous introduisons l'hémolysine inactivée dans le péritoine de nos cobayes, cette hémolysine ne se fixe pas exclusivement sur les érytrocytes de la lymphe péritonéale, mais aussi sur les globules blancs de cette lymphe*. Or, s'il en est ainsi, on conçoit à quel point les phénomènes qui ont lieu au delà de la cavité péritonéale sont sous la dépendance de cette répartition de l'hémolysine; on entrevoit également que le mécanisme qui préside à la genèse de l'anémie, pourrait être tout autre que celui dont parle M. Gruber.

En effet, les recherches de Savtchenko tendent à prouver *que les globules blancs ayant « fixé » la sensibilisatrice hémolytique,*

1. Il est à supposer que parmi les groupes moléculaires (*groupes haptophores* ou *récepteurs* d'après le conception de M. Ehrlich) qui, introduits dans un organisme d'espèce différente, engendrent une sensibilisatrice spécifique, il y en a quelques-uns qui n'existent pas exclusivement dans une seule catégorie de cellules, mais sont répandus, quoique à un degré très inégal, dans plusieurs espèces cellulaires. Le nombre de ces groupes atteint son maximun dans la catégorie de cellules qui sert à l'immunisation, dans notre cas, les érytrocytes. Aussi, la cytotoxine obtenue à l'aide de ces érytrocytes se fixe-t-elle non seulement sur les hématies, mais aussi, quoique plus faiblement, sur d'autres cellules. *La spécificité réside plutôt dans tout l'ensemble de l'espèce animale, que dans les cellules appartenant à tel ou tel organe considéré en particulier.* Voir à ce propos les recherches de v. Dungern. *Münch. med. Woch.*, 1900.

englobent plus facilement et plus rapidement les érytrocytes, que les mêmes globules blancs normaux. Ce fait ressort également de l'expérience que nous avons relatée plus haut, où l'on voit que l'injection de cette hémolysine dans le péritoine des *cobayes préparés* détermine une forte érytrophagocytose de la part des macrophages. Or, ce processus pourrait également avoir lieu au delà de la cavité péritonéale : dans ce cas, la destruction des globules rouges pourrait fort bien s'opérer, sans qu'il soit nécessaire, comme le veut M. Gruber, de faire intervenir la cytase.

A vrai dire, M. Savtchenko ne démontre pas que les leucocytes *fixent* réellement la sensibilisatrice hémolytique. Les expériences de ce savant prouvent tout simplement que les globules blancs *influencés* par cette sensibilisatrice, phagocytent plus facilement les hématies. Nos recherches, ne laissant aucun doute sur la réalité de cette fixation, complètent les expériences de cet auteur et fournissent un point d'appui solide à la conception d'après laquelle l'anémie chez les animaux qui reçoivent des hémolysines inactives, est due au moins en partie, à l'érytrophagocytose. Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre suivant.

Résumé. — I. L'introduction d'une dose donnée de sérum hémolytique inactivé dans le péritoine des cobayes *neufs*, détermine soit directement, soit indirectement (au moyen de la leucotoxine), une phagolyse dont la conséquence immédiate est la mise en liberté d'une quantité variable de cytase, capable de réactiver une partie de cette sensibilisatrice. *Il y a donc réactivation partielle au sein même de la cavité péritonéale*, chose dont M. Gruber ne tient pas compte, mais dont l'importance est telle que, si l'observation directe dont nous parlerons plus loin, ne nous autorisait pas d'enlever toute vraisemblance à l'hypothèse de la liberté de la cytase dans le plasma, elle permettrait déjà de considérer comme prématurées les affirmations de cet auteur. En effet, *comment peut-on, en partant du simple fait que les animaux auxquels on administre dans le péritoine des hémolysines inactivées, offrent de l'anémie et de l'hémoglobinurie, arriver à la conclusion que ces hémolysines sont réactivées par une cytase circulant à l'état de liberté dans le plasma, si l'on ne démontre pas au préalable que cette réactivation ne s'opère pas déjà dans le péritoine, au moyen de la phagolyse ?*

II. L'introduction de l'hémolysine inactivée dans le péritoine des cobayes *préparés* ne détermine pas la phagolyse et par conséquent *elle n'est pas suivie d'une réactivation de la sensibilisatrice.* Ce qui prédomine, dans ce cas, c'est l'*érytrophagocytose de la part des macrophages.*

II

LES PHÉNOMÈNES QUI ONT LIEU AU DELA DE LA CAVITÉ PÉRITONÉALE

Considérons tout d'abord les modifications que présentent les *cobayes neufs* par rapport aux *animaux préparés*, lorsqu'on pratique une injection intrapéritonéale de 6 à 7 c. c. de sérum hémolytique inactivé. Il résulte de nos nombreuses expériences que *tous les signes, tant ceux qui ont trait au taux des globules rouges, que ceux qui se rapportent à la sécrétion rénale, sont plus accusés chez les cobayes préparés que chez les cobayes non préparés.* Les animaux chez lesquels on a provoqué une leucocytose péritonéale plus ou moins forte, montrent en premier lieu une anémie plus précoce et plus accentuée, en second lieu une hémoglobinurie plus intense et plus durable. Voici quelques chiffres :

COBAYE N° I, NON PRÉPARÉ		COBAYE N° I', PRÉPARÉ	
12 h. ap. l'inj.	Sang D = — 2.700.000. H = 0.	12. ap. l inj.	Sang D = — 4 400.000. H = 0.
22 h. —	Sang D = + 2.400.000. H = 0.	22 h. —	Sang D = — 3.600.000. H = +.
44 h. —	Sang D = + 1.000.000. H = 0.	44 h. —	Sang D = — 4.100.000. H = +.

COBAYE N° II, NON PRÉPARÉ		COBAYE N° II' PRÉPARÉ	
20 h. ap. l'inj.	Sang D = — 0.130.000. H = 0.	20 h. ap. l'inj.	Sang D = — 2.100.000. H = 0.
40 h. —	Sang D = — 3.200.000. H = 0.	22 h. —	H = +.
82 h. —	Sang D = — 4.0000.00. H = +	40 h. —	Sang D = — 4.700.000. H = +
L'animal meurt après 84 heures.		L'animal meurt à la 43e heure.	

1. D signifie la différence en plus (+) ou en moins (—) du nombre des globules rouges. H = + signifie présence d'hémoglobine, H = 0 signifie absence d'hémoglobine dans l'urine

Si l'on rapproche les faits que nous avons enregistrés lorsque nous avons examiné ce qui se passe dans le péritoine, de la gravité des signes provoqués par l'administration de l'hémolysine, nous arrivons à la conclusion que l'*anémie et l'hémoglobinurie, ainsi que la destinée finale des animaux, sont en rapport direct avec la phagocytose et en rapport inverse avec la mise en liberté de la cytase dans la cavité péritonéale, ou, ce qui revient au même, avec le degré de réactivation de cette sensibilisatrice.*

Ainsi, la cytase qui s'échappe des leucocytes lors de la phagolyse provoquée par l'injection, ne nous apparaît pas comme jouant un rôle appréciable dans la genèse de l'anémie et de l'hémoglobinurie. Il n'en est pas de même de l'érytrophagocytose; en effet l'englobement des globules rouges atteint son maximum chez les animaux préparés, c'est-à-dire là où cette anémie et cette hémoglobinurie revêtent une gravité exceptionnelle. A vrai dire, en établissant ce rapprochement, nous ne faisons que mettre en rapport de causalité deux ordres de phénomènes qui marchent, parallèlement et rejeter un troisième ordre de faits, qui ne suit pas les mêmes variations. Il est donc nécessaire de pousser plus loin notre analyse, et voir si réellement l'importance de la phagocytose dans la production de l'anémie et de l'hémoglobinurie est telle, qu'un simple examen sommaire nous permet de le supposer.

Voici les résultats auxquels nous sommes arrivés :

I. — *La sensibilisatrice hémolytique introduite dans le péritoine est rapidement résorbée; elle va se loger de préférence dans les organes qui normalement, servent à la destruction des hématies (en particulier la rate).*

On peut s'assurer de ce fait : 1° en recherchant la teneur en sensibilisatrice des divers organes prélevés chez un cobaye préparé, 3 à 4 heures après l'injection intrapéritonéale de 7 c. c. de sérum hémolytique inactivé; 2° en examinant la teneur en hémoglobine des extraits de ces organes.

Expérience E. — Un cobaye pesant 540 grammes reçoit dans le péritoine 10 c. c. d'eau physiologique. 18 heures après l'injection, la lymphe péritonéale renferme une grande quantité de leucocytes poly. et mononucléaires. A ce moment on pratique une nouvelle injection de 6 c. c. de sérum hémolytique inactivé. L'animal est saigné à blanc 4 heures après. On trouve une

hypertrophie manifeste de la rate ; l'organe a une coloration brun foncé.

On triture la rate, ainsi que des poids équivalents de foie et de rein dans 5 c. c. d'eau physiologique. Après 20 heures de séjour à la glacière, on centrifuge et on apprécie la teneur en sensibilisatrice des liquides décantés.

SANG de cobaye 5 0/0.	CYTASE de cobaye.	EAU physiol.	EXTRAIT DE RATE	EXTRAIT de foie.	EXTRAIT de rein.
0,5 c. c.	0.3	1.5	0,5 presque complet.	Trace.	Nul.
0,5 —	0,3	1.0	1,0 — —	Partiel.	Nul.
0,5 —	0.3	0	2,0 complet.	Presque complet.	Trace.

Expérience F. — On procède de la même façon que dans l'expérience précédente. On apprécie la richesse en hémoglobine des liquides décantés.

Rate H = + + + (rouge foncé).
Foie H = + (rosé).
Rein H = 0 (incolore).

Les extraits d'organes provenant de cobayes normaux (rate et foie) ne renferment qu'une quantité insignifiante d'hémoglobine.

Il résulte de ces expériences plusieurs fois répétées, que *des trois organes examinés, dont un, le rein, est riche en sang, seuls le foie et surtout la rate renferment des quantités appréciables de sensibilisatrice hémolytique.* Ce dernier organe est le plus riche en hémoglobine et exerce le pouvoir dissolvant le plus intense vis-à-vis des érytrocytes de cobaye.

II. — L'examen histologique montre que *l'organe splénique où, comme nous l'avons vu, il s'opère une accumulation de sensibilisatrice, est le siège d'une intense phagocytose des globules rouges.* On voit sur des coupes de rate prélevée chez des cobayes préparés, sacrifiés 4, 15, 20 et 40 heures après l'injection, que les macrophages englobent un nombre considérable d'hématies. On constate de plus, soit sur des frottis suspendus dans du sérum artificiel, soit sur ces coupes, qu'*aucune dissolution extracellulaire des globules rouges n'a lieu.* La phagocytose s'exerce vis-à-vis d'érytrocytes qui ont conservé tous leurs caractères normaux.

La conclusion qui se pose est que *dans le processus qui préside à la genèse de l'anémie, il faut tenir compte de l'action directe des éléments leucocytaires.* Il en est de même pour ce qui concerne

l'*hémoglobinurie*. En effet, comme l'observation directe nous l'a maintes fois montré, les hématies incluses dans les macrophages ne tardent pas à confluer et à se transformer dans des masses plus ou moins grandes de substance hémoglobinifère. La cellule entière s'imprègne d'hémoglobine et l'on peut concevoir facilement comment cette hémoglobine, soit par simple diffusion, soit après l'éclatement des macrophages, peut se répandre dans le milieu environnant et passer dans l'urine.

Or, TOUS CES PHÉNOMÈNES, A SAVOIR D'UNE PART LA RICHESSE EN SENSIBILISATRICE ET EN HÉMOGLOBINE DES ORGANES HÉMATOLYTIQUES, D'AUTRE PART LA PHAGOCYTOSE DES HÉMATIES DANS LA RATE, SONT DE BEAUCOUP PLUS ACCENTUÉS CHEZ LES ANIMAUX PRÉPARÉS QUE CHEZ LES COBAYES NEUFS (voir planche III, fig. 1 et 2). Plus encore chez ces animaux préparés, nous avons constaté dans le torrent circulatoire (sang puisé à l'oreille) des macrophages et des leucocytes polynucléaires renfermant des globules rouges. *Cette phagocytose s'exerce donc non seulement dans les organes, mais aussi dans la circulation générale* (voir planche IV, fig. 3).

Il résulte de ces faits que *l'intensité et la marche de l'anémie et de l'hémoglobinurie sont proportionnelles au degré de phagocytose intra-splénique, et non pas à la réactivation intrapéritonéale de la sensibilisatrice.* L'importance de la cytase que la phagolyse met en liberté dans le péritoine devient pour ainsi dire nulle. En est-il de même de la cytase supposée libre dans le plasma circulant?

III. — Nous avons vu que la conception d'après laquelle le plasma circulant renferme de la cytase libre et capable d'agir, est incompatible avec l'existence, chez nos animaux, de la combinaison suivante :

Plasma incolore, renfermant de la sensibilisatrice + globules rouges sensibilisés.

On ne peut pas concevoir, en effet, d'après cette conception, qu'à un même moment, des globules sensibilisés puissent exister dans un plasma contenant de la sensibilisatrice, sans qu'une dissolution plus ou moins complète de ces globules ait lieu, et sans que ce plasma ne renferme au moins des traces d'hémoglobine. La cytase supposée libre dans le plasma ne doit pas tarder à réactiver la sensibilisatrice fixée sur les érytrocytes et déterminer la dissolution de ces érytrocytes.

Or, voici ce que l'expérience permet de constater :

Expérience G. — Cobayes A (P = 425 grammes) et B (P = 500 grammes), B reçoit dans le péritoine 10 c. c. d'eau physiologique. 18 heures après, on pratique chez ces deux cobayes une injection intrapéritonéale de 7 c. c. sérum hémolytique inactivé. Les animaux sont saignés à blanc, quatre heures après l'injection.

Le sang des deux animaux sert à préparer le *plasma* (tubes paraffinés, méthode de Gengou) et à obtenir *le sérum, après coagulation de ce sang* IN TOTO, *et séjour à la température de la chambre* (17 heures).

On constate : 1° *Que le plasma obtenu par centrifugation immédiatement après la saignée, est incolore ;*

2° *Que le sérum, renfermant de la cytase mise en liberté pendant la coagulation, est coloré, et que la coloration du sérum B est plus intense que celle du sérum A ;*

3° *Qu'un sérum provenant d'un cobaye normal, préparé de la même manière, est incolore.*

Voici la teneur en sensibilisatrice de ces sérums et des globules rouges lavés, provenant des cobayes A et B.

PLASMA DU COBAYE A (NON PRÉPARÉ)

Sang de cobaye 5 0/0	Plasma.	Cytase de cobaye.	Eau physiologique.	Résultat *
0,5 c. c.	0,5	0,5	0,5	Nul
0,5 —	1,0	0,5	0	trace

PLASMA DU COBAYE B (PRÉPARÉ)

Sang de cobaye 5 0/0	Plasma.	Cytase de cobaye.	Eau physiologique.	Résultat.
0,5 c. c.	0,5	0,5	0,5	Beaucoup
0,5 —	1,0	0,5	0	—

SÉRUM DU COBAYE A (NON PRÉPARÉ)

Sang de cobaye 5 0/0	Sérum	Cytase de cobaye.	Eau physiologique.	Résultat.
0,5 c. c.	0,1	0,5	1,1	Nul
0,5 —	0,5	0,5	0,7	—
0,5 —	1,0	0,5	0,2	trace

SÉRUM DU COBAYE B (PRÉPARÉ)

Sang de cobaye 5 0/0.	Sérum	Cytase de cobaye.	EAU physiologique.	Résultat
0,5 c. c.	0,1	0,5	1,1	Trace.
0.5 —	0.5	0.5	0.7	Partiel.
0,5 —	1.0	0,5	0,2	—

HÉMATIES DU COBAYE A + CYTASE

Sang de cobaye A.	Cytase de cobaye.	Eau physiologique.	Résultat.
1 goutte.	0,5	0,5	Trace.
1 —	1.0	0	—

HÉMATIES DU COBAYE B + CYTASE

Sang de cobaye B.	Cytase de cobaye.	Eau physiologique.	Résultat.
1 goutte.	0,5	0.5	Trace.
1 —	0,1	0	Partiel.

HÉMATIES D'UN COBAYE TÉMOIN + CYTASE

SANG de cobaye N.	Cytase de cobaye.	EAU physiologique.	Résultat.
1 goutte.	0,5	0,5	Nul.
1 —	1,0	0	—

* Dans toutes ces expériences on a ajouté un excès de cytase. Les résultats ont été enregistrés après 12 heures de séjour au thermostat.

Donc lorsqu'on examine le plasma et les hématies des cobayes sacrifiés 4 heures après l'injection intrapéritonéale d'hémolysine inactivée, c'est-à-dire à un moment où *cette hémolysine a été résorbée en grande partie*[1], et où les organes hématolytiques (la rate) renferment de la sensibilisatrice et sont le siège d'une érytrophagocytose intense, voici ce que l'on constate :

1° *Le plasma est dépourvu d'hémoglobine ;*

2° *Le plasma contient de la sensibilisatrice ;*

3° *Une partie des érytrocytes qui flottent dans ce plasma ont fixé cette sensibilisatrice ;*

4° *La richesse du plasma et des globules rouges en sensibilisatrice est plus grande chez les cobayes préparés que chez les témoins.*

Par conséquent, *si quatre heures après l'injection, les globules sensibilisés ne se dissolvent pas* IN VIVO, *pour céder leur hémoglobine au plasma, c'est que ce plasma est dépourvu de cytase capable d'agir, ou qu'il n'en contient que trop peu, ce qui revient au même*[2].

On peut objecter à cette conclusion :

1° Que lorsqu'une dissolution extra-cellulaire des hématies a lieu dans le torrent circulatoire, le plasma (méthode de Gengou) ne doit pas forcément contenir de l'hémoglobine ;

2° Que l'hémoglobine, une fois mise en liberté dans ce plasma, est rapidement et intégralement éliminée par le rein.

Ces objections peuvent être facilement écartées. Il suffit pour cela d'examiner le plasma des cobayes sacrifiés peu de temps après avoir pratiqué à ces animaux une *injection intravasculaire de 0,6 c. c. hémolysine inactivée*. On constate alors que parallèlement à l'hypoleucocytose et à la phagolyse[3] qui s'opèrent constamment à la suite de cette injection, la cytase leucocytaire est mise en liberté. Cette cytase réactive la sensibilisatrice fixée sur les hématies circulantes et détermine la dissolution d'une partie de ces hématies. *Or, dans ce cas, le plasma obtenu suivant la méthode des tubes paraffinés renferme de l'hémoglobine.*

1. Cette résorption a été constamment plus précoce chez les animaux préparés que chez les cobayes témoins.

2. Cette expérience montre également que l'injection de l'hémolysine ne détermine pas, comme l'a supposé nouvellement M. Gruber, la mise en liberté de la cytase.

3. Cette phagolyse et cette leucopénie se sont montrées constantes dans nos expériences. La préparation des animaux n'empêche que très difficilement leur apparition.

Quant à la seconde objection, à savoir que le plasma ne renferme pas d'hémoglobine, pour le motif que cette hémoglobine s'élimine intégralement par le rein au fur et à mesure qu'elle est mise en liberté, elle tombe devant le fait *que le contenu vésical des cobayes sacrifiés à la 4e heure, ne renferme la moindre trace de cette substance.* Or, il suffit que ce principe colorant existe à une concentration donnée dans le plasma, pour qu'il apparaisse dans l'urine. En effet, si chez les animaux qui reçoivent dans la circulation générale 0,6 c. c. d'hémolysine inactivée, on ouvre la vessie à un moment où le plasma contient de l'hémoglobine, on constate que l'urine a une couleur rouge plus ou moins prononcée.

Ces objections une fois écartées, les recherches exposées plus haut permettent de conclure *que le plasma circulant ne renferme pas la cytase hémolytique à l'état de liberté, et que par conséquent, la réactivation de la sensibilisatrice introduite dans le péritoine ne peut pas s'opérer dans le torrent circulatoire.*

*

S'il en est ainsi, la conclusion de M. Gruber se trouve en désaccord avec les trois *desiderata* que l'on déduit nécessairement de cette conclusion. Le mécanisme qui préside à la genèse de l'anémie et de l'hémoglobinurie, se réduit à ceci :

La sensibilisatrice hémolytique introduite dans le péritoine rencontre les leucocytes de la lymphe péritonéale et les globules rouges qui préexistent dans cette lymphe, ou qui arrivent immédiatement après l'injection, par suite de l'hémorragie occasionnée par cette injection. Une partie de cette sensibilisatrice se fixe sur ces leucocytes et sur ces hématies; une autre partie, et la plus considérable, reste libre. Si la phagolyse a lieu, la cytase mise en liberté par les globules blancs détériorés réactive la sensibilisatrice fixée sur les globules blancs et sur les érytrocytes : il y a leucolyse et hémolyse. Si l'on a soin d'empêcher cette phagolyse, on assiste exclusivement au phénomène de l'érytrophagocytose.

La partie de la sensibilisatrice restée libre, passe dans la circulation générale. Là, elle se répartit entre les érytrocytes et les leucocytes circulants, le plasma et les macrophages de la rate et peut-être aussi ceux du foie. La cytase n'étant pas à l'état de liberté dans le

plasma, il n'y a pas de dissolution extracellulaire des érytrocytes sensibilisés. Au contraire, on peut constater qu'un certain nombre de globules rouges sont englobés par les macrophages et les microphages du sang. La sensibilisatrice accumulée dans la rate agit indirectement sur les érytrocytes qui traversent cet organe : elle détermine une forte érytrophagocytose, qui s'opère au moyen des macrophages. Cette érytrophagocytose splénique est, sinon la seule cause, du moins la principale des causes qui président à la genèse de l'anémie et de l'hémoglobinurie, chez les individus auxquels on administre, par voie intra-péritonéale, des hémolysines inactivées.

Nous accomplissons un précieux devoir en remerciant ici M. Metchnikoff, des conseils qu'il nous a prodigués au cours de ce travail.

LÉGENDE DES PLANCHES III ET IV

PLANCHE III. — *Fig. 1. Coupe de rate provenant d'un cobaye* NON PRÉPARÉ. — L'animal a reçu dans la cavité péritonéale 6 c. c. d'hémolysine inactivée. Il a été sacrifié 48 heures après l'injection. Pas d'hémoglobinurie; anémie légère.

L'érytrophagocytose est peu marquée.

S, sinus avec *m*, *M'*, macrophages renfermant un globule rouge et du pigment; *m'*, macrophage à protoplasma basophile; *m''*, monucléaire pigmentophore. *M*, macrophage renfermant trois érytrocytes. *tr*, trabécule; *n*, normoblaste. Fixation au sublimé, coloration au bleu de méthylène-éosine-orange.)

Fig. 2. Coupe de rate provenant d'un cobaye PRÉPARÉ. — L'animal a reçu dans la cavité péritonéale 6 c. c. d'hémolysine inactivée. Il a été sacrifié 48 heures après l'injection. Hémoglobinurie, anémie très accentuée.

L'érytrophagocytose est de beaucoup plus prononcée que chez le cobaye témoin (fig. 1).

S, sinus avec *m'*, macrophage bourré d'érytrocytes, et m'', cellule pigmentophore; *M*, macrophage à protoplasma basophile; *tr*, trabécule.

S', sinus avec *m'''*, macrophage renfermant deux globules rouges entiers, et plusieurs stromas dépourvus d'hémoglobine.

S'', sinus avec *M'*, macrophage contenant du pigment dans une vacuole: *n*, normoblaste. (Même coloration).

PLANCHE IV. — *Figure 1. Exsudat péritonéal d'un cobaye* NON PRÉPARÉ, *ayant reçu dans le péritoine 6 c. c. d'hémolysine inactivée.* 20 heures après l'injection.

L'érytrophagocytose est, pour ainsi dire, nulle.

m, *m''*, macrophages renfermant un polynucléaire et un globule rouge; *m'*, gros mononucléaire contenant une masse brune; (pigment?) *p*, polynucléaire pseudo-éosinophile; *e*, érytrocyte (chaleur, triacide).

Fig. 2. Exsudat péritonéal d'un cobaye PRÉPARÉ, ayant reçu dans le péritoine 6 c. c. d'hémolysine inactivée. 20 heures après l'injection.

L'érytrophagocytose atteint son maximum.

M, macrophage ayant phagocyté plusieurs hématies et leucocytes polynucléaires.

En *h* on voit la masse hémoglobinifère de ces hématies confluer autour du protoplasma granuleux des polynucléaires.

p, leucocyte pseudo-éosinophile ayant englobé un globule rouge.

Figure 3. Un macrophage (*m*) et deux polynucléaires (*p*) provenant de *la circulation générale d'un cobaye préparé* (sang puisé à l'oreille). Ces cellules ont englobé des hématies.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE LA PIROPLASMOSE CANINE

PAR MM. NOCARD, D'ALFORT, ET MOTAS, DE BUCHAREST.

L'un de nous a publié, l'an dernier, avec M. Almy[1], une observation d'hémoglobinurie du chien, qu'une étude attentive avait permis de rattacher à la présence d'hématozoaires (piroplasma) analogues à ceux de la fièvre du Texas; du sang de ce chien, injecté dans la jugulaire d'un chien neuf, lui avait donné la maladie avec tous les caractères qu'elle présentait chez le premier. Cette observation a été le point de départ des recherches expérimentales qui font l'objet de ce mémoire. Elle n'est d'ailleurs pas restée isolée; depuis, nous avons pu étudier, à la clinique d'Alfort, 7 nouveaux cas semblables : 5 dans le service du professeur Almy qui en a publié l'observation[2]; les 2 autres, dans le service du professeur Cadiot, sont encore inédits.

La *piroplasmose canine* n'est donc pas absolument rare en France[3] et la similitude de l'évolution de la maladie naturelle et de la maladie expérimentale donne à ce travail un réel intérêt pratique.

La maladie paraît exister également en Italie. Piana et Galli-Valerio ont décrit et figuré le parasite qu'ils ont observé

1. NOCARD ET ALMY, Une observation de piroplasmose canine, *Bulletin de la Société centrale de médecine vétérinaire*, 1901, p. 192.
2. ALMY, Nouveaux cas de piroplasmose canine, *Ibidem*, 1901, p. 375.
3. M. P. LEBLANC, dans une courte note présentée à la Société de Biologie, le 20 janvier 1900, dit avoir vu, dans le sang d'un chien atteint d'ictère infectieux, de nombreux hématozoaires, « libres dans le plasma ou fixés sur les globules ». Il est probable qu'il a eu affaire à un cas de piroplasmose; mais la description qu'il fait du parasite est si brève et si peu précise qu'on ne saurait l'affirmer.

sur deux chiens, l'un ictérique, l'autre anémique [1]; ils signalent son analogie avec celui de la fièvre du Texas; mais il ne semble pas que ces auteurs aient poussé plus loin leurs recherches, car ils n'ont rien publié depuis cette première note.

Celli [2] rapporte que l'on a observé dans la campagne romaine, sur des chiens venus de Lombardie, des hématozoaires semblables à ceux décrits par Piana et Galli-Valerio.

La maladie paraît plus fréquente en Afrique. R. Koch dit l'avoir observée plusieurs fois pendant son séjour dans l'est-africain [3]. Marchoux l'avait déjà vue au Sénégal; il a présenté à la Société de biologie [4] des dessins de piroplasma observés dans le sang de onze chiens indigènes, qui paraissaient d'ailleurs en très bonne santé.

On la connaît au Cap sous les noms de *fièvre bilieuse*, *fièvre malarique* et surtout de *jaunisse maligne*. Duncan Hutcheon l'a bien décrite en 1899, dans une courte note [5], où il insiste sur sa nature parasitaire, déjà signalée par le Dr Carrington Purvis, et sur sa transmissibilité par l'inoculation du sang parasité qu'il a pu réaliser avec le concours de Spreul.

Un travail plus étendu de W. Robertson [6] confirme et complète au double point de vue expérimental et clinique les indications de Duncan Hutcheon.

Enfin, un très intéressant mémoire de Lounsbury [7], dont le travail de Robertson donne le résumé, montre que la « jaunisse maligne » du chien, causée par un piroplasme analogue à celui de la fièvre du Texas, se propage comme elle par l'intermédiaire d'un ixode spécial que le professeur Neumann de Toulouse a déterminé, l'*Hæmaphysalis leachi* (Audouin).

ÉTUDE CLINIQUE DE LA MALADIE

La piroplasmose canine présente, au point de vue clinique,

1. Piana et Galli-Valerio, Su di un' infezione del cane, con parasiti endoglobulari nel sangue. *Moderno zooiatro*, 1895, n° 9).
2. Celli, *La Malaria, secondo le nueve ricerche*, 2e édition, Roma, 1900, p. 31.
3. R. Koch, *Reiseberichte uber... Texas fever...*, Berlin, 1898.
4. Marchoux, *Bulletin de la Société de Biologie*, 1900, 27 janvier.
5. Duncan Hutcheon, Malignant jaundice in Dog, *Vétérinary Journal*, 1899, p. 399.
6. W. Robertson, Malignant jaundice in the Dog, *The Journal of compar. Pathol. and Thérap.*, décembre 1901, page 327.
7. Lounsbury, Transmission at malignant jaundice of the Dog, by a species of Tick, *The Journal agricultural*, Cape Town, novembre 1901.

deux formes bien distinctes; dans l'une, l'évolution est rapide et presque toujours suivie de mort; dans l'autre, l'évolution lente aboutit ordinairement à la guérison.

1° *Forme aiguë.* — La maladie s'accuse tout d'abord par l'inappétence et la tristesse. Le chien reste couché dans un coin, insensible à ce qui l'entoure, sourd aux appels de son maître.

Dès ce moment, il a de la fièvre; sa température s'élève au-dessus de 40°, se maintient à un chiffre élevé pendant 2 ou 3 jours, puis tombe brusquement au-dessous de la normale;

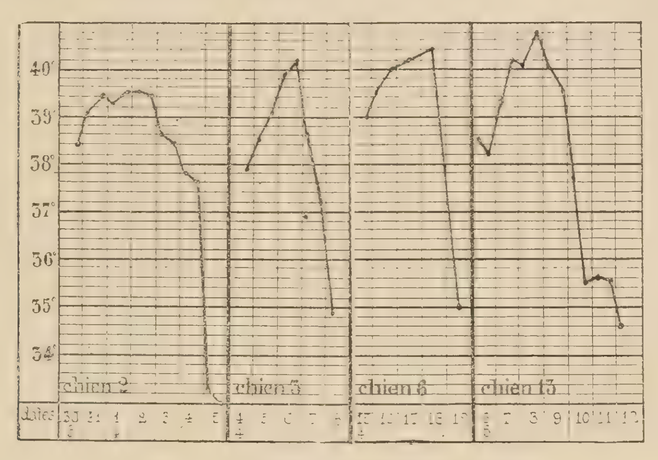


Fig. 1. Forme aiguë. Injection intra-veineuse.

elle peut s'abaisser jusqu'à 33°; parfois, mais rarement, la courbe thermique n'a pas cette régularité; la température, toujours élevée, a de grandes oscillations et la chute se fait lentement et graduellement; chez les très jeunes chiens qui succombent très vite à l'infection, l'hyperthermie du début fait souvent défaut et, dès l'apparition des parasites intraglobulaires, la température s'abaisse jusqu'à la mort.

Pendant toute la durée de la maladie l'anorexie est complète, le nez est sec et chaud; l'animal reste couché, replié sur lui-même, l'œil terne, insensible à toutes les excitations.

Les muqueuses (œil et bouche), d'abord pâles, deviennent peu à peu violacées, puis légèrement ictériques (dès que l'hypothermie est accusée).

Mais l'ictère n'est pas constant, et son intensité est très

variable. Sur 63 cas à marche rapide, nous l'avons observé 30 fois; dans les 21 autres cas, les muqueuses sont restées plus ou moins pâles, avec, parfois, une teinte bleuâtre peu accusée.

Quand il y a de l'ictère, les sclérotiques et les téguments y participent comme les muqueuses. Le pouls est vite (120-160 par minute), petit, filiforme, assez souvent intermittent. La respiration accélérée (36-48 par minute) est pénible, anhélante, et souvent, chez les jeunes, accompagnée de plaintes.

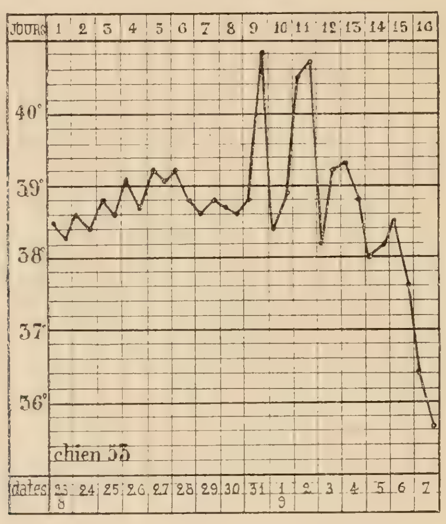


Fig. 2. Forme aiguë. Injection sous-cutanée.

Dans quelques cas rares, il se manifeste des vomissements de matières muqueuses verdâtres, parfois incoercibles.

L'exploration de la poitrine ne révèle rien d'anormal.

La palpation du ventre permet parfois de constater l'hypertrophie de la rate; mais cette lésion est loin d'être la règle.

La sensibilité générale est abolie; les malades ne répondent à aucune excitation; ils semblent ne pas s'apercevoir des opérations qu'on leur fait subir.

Dès le début, la marche est gênée, pénible, titubante, surtout dans le train postérieur, puis il survient de la parésie; les chiens ne se relèvent qu'avec peine, tombent souvent quand on les force à marcher; enfin pendant la période d'hypothermie la paraplégie est presque absolue. A l'approche de la mort, l'animal tombe dans le coma; il s'éteint doucement, sans agitation.

Une seule fois (chien n° 29) nous avons observé de véritables convulsions tétaniformes et l'animal est mort en opisthotonos avec contraction de tous les muscles.

Dès l'apparition des premiers symptômes, même lorsqu'on ne voit aucun parasite, l'urine est albumineuse et le restera jusqu'à la mort : la quantité d'albumine augmente avec le nombre des parasites.

Souvent elle est rose, rouge foncé, ou noire comme du marc de café; cette coloration n'est pas due à la présence de sang en nature, car jamais on ne trouve de globules rouges dans l'urine; il y a hémoglobinurie et non hématurie ; l'hématospectroscope de Hénocque y montre les 2 bandes qui caractérisent l'oxy-hémoglobine. La quantité d'hémoglobine peut atteindre jusqu'à 3 1/2 0/0.

La crise hémoglobinurique commence d'ordinaire peu après l'apparition des parasites endoglobulaires ; dans les cas suraigus, chez les très jeunes chiens notamment, elle persiste jusqu'à la mort; on trouve à l'autopsie la vessie distendue par une urine noire comme du jus de pruneau.

Quand la maladie dure un peu plus longtemps, l'hémoglobinurie disparaît et l'urine redevient jaune foncé, parfois nettement ictérique.

L'hémoglobinurie n'est pas constante : sur les 6 cas observés par MM. Nocard et Almy, elle n'a été notée que 3 fois ; mais, comme elle est parfois très fugace, il est possible qu'elle soit passée inaperçue.

Sur les 63 chiens qui sont morts entre nos mains après inoculation, 43 ont eu de l'hémoglobinurie plus ou moins intense et durable.

Les réactions de Gmelin et de Craft montrent dans l'urine la présence du pigment biliaire, surtout dans les cas qui s'accompagnent d'ictère ou d'hémoglobinurie ; la réaction de l'urine est acide ; une seule fois nous l'avons trouvée alcaline et deux fois neutre ; parfois, mais rarement, il existe de la polyurie.

Le sang se modifie profondément ; il est pâle comme s'il avait été mélangé d'eau; la coagulation est plus tardive, le caillot est plus mou et moins foncé que d'ordinaire ; le sérum est de teinte rouge foncé ; l'intensité de la coloration du sérum est variable ; mais elle augmente rapidement avec le temps ; il semble que la

fragilité des globules, déjà notable chez le chien sain, augmente considérablement sous l'influence de la maladie. Dans les formes subaiguës, quand la crise hémoglobinurique a fait place à l'ictère, le sérum exsudé du caillot a une teinte jaune très foncée avec, parfois, un reflet verdâtre.

Lorsqu'on a recueilli du sang dans une éprouvette au fond de laquelle on a déposé quelques gouttes d'une solution de citrate de potasse pour empêcher la coagulation, les globules s'accumulent au fond du récipient où ils forment une masse de couleur violet foncé, dont la hauteur mesure à peine le 1/5e, le 1/10e et parfois le 1/15e de la hauteur du plasma.

La numération des globules permet d'apprécier la destruction globulaire considérable qui s'est produite. Chez le chien sain, le nombre des hématies varie entre 6,500,000 et 7,000,000 (procédé Malassez). Dès l'apparition des premiers symptômes, le chiffre des globules diminue lentement et régulièrement; puis, au moment de la crise hémoglobinurique, il tombe brusquement à 2 millions et au-dessous. Le taux de l'hémoglobine s'abaisse parallèlement de 12-13 0/0 à 6,4 et 3 1/2 0/0.

Au contraire des hématies, les globules blancs augmentent de nombre; on en compte de 7 à 8,000 chez le chien sain; chez les chiens malades, ce chiffre est doublé, triplé ou quadruplé: nous en avons compté jusqu'à 40 mille (chien 59).

L'augmentation porte presque exclusivement sur les polynucléaires; elle est plus accusée encore dans les formes lentes de la maladie.

L'altération du sang ne consiste pas seulement dans la diminution considérable du nombre des hématies; lorsqu'on examine une préparation de sang frais, ou colorée après fixation, on est frappé des dimensions différentes des globules rouges; il en est dont le diamètre est supérieur d'un tiers, de la moitié, ou des deux tiers à celui des globules normaux; ils paraissent aussi plus pâles et ils fixent la couleur d'une façon moins intense; on observe aussi sur les préparations colorées un nombre anormal de globules nucléés. Ces altérations globulaires sont encore plus accusées dans les formes lentes.

La forme aiguë de la maladie se termine ordinairement par la mort qui survient du 3e au 10e jour après l'apparition des premiers symptômes;

2° *Forme lente.* — La forme lente se traduit surtout par l'anémie profonde, la faiblesse musculaire, parfois de la fièvre, rarement par un peu d'hémoglobinurie ou d'ictère.

La fièvre, quand elle existe, ne se montre qu'au début de l'infection; elle est toujours peu accusée et dure 2 ou 3 jours à peine; elle fait le plus souvent défaut; le plus souvent aussi, elle passe inaperçue, rien de grave dans l'état du sujet n'appelant l'attention du propriétaire; on ne la constate guère que dans la maladie expérimentale. Comme dans la forme aiguë, elle apparaît de bonne heure, plus tôt quand l'animal a été inoculé dans les veines que lorsqu'il a été inoculé sous la peau; la tem-

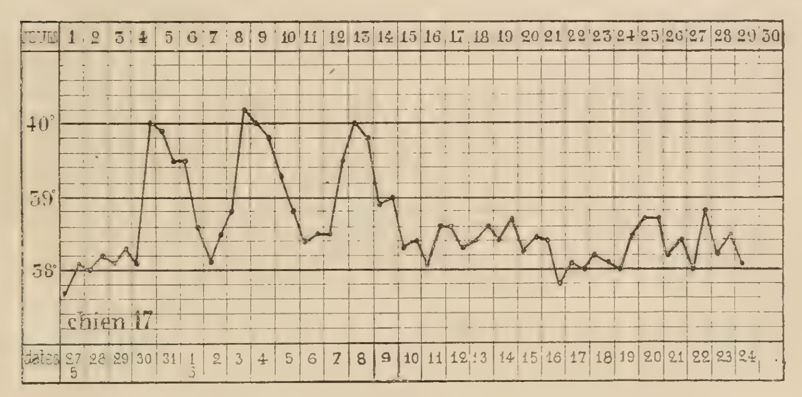


Fig. 3. Forme chronique. Type rémittent. — Injection intraveineuse.

pérature dépasse rarement 40°, se maintient à ce chiffre 36 ou 48 heures, puis revient à la normale; une fois pourtant nous avons observé une véritable fièvre quarte sur l'un de nos inoculés (chien n° 17). Le plus souvent la fièvre est insignifiante ou fait complètement défaut.

L'anémie est le symptôme le plus constant de cette forme. Elle s'accuse par la pâleur progressive des muqueuses, la nonchalance des animaux, qui restent volontiers couchés, indifférents à ce qui les entoure, la diminution de l'appétit, l'amaigrissement, la faiblesse générale, la sécheresse de la peau, l'état terne des poils. Elle dure longtemps, de 3 à 6 semaines; puis, peu à peu, l'appétit et la gaîté reparaissent, les muqueuses se colorent et l'animal reprend ses forces ; la guérison est complète en 6 semaines à 2 ou 3 mois.

Si l'on examine l'urine dès le début de l'infection, on y trouve ordinairement un peu d'albumine, qui persiste 15 à 20 jours.

L'hémoglobinurie est très rare: quand elle existe, elle ne dure guère que 1 ou 2 jours; le plus souvent, l'urine reste jaune et limpide; parfois cependant elle est sédimenteuse. Sa réaction est acide; une seule fois nous l'avons trouvée neutre : l'urine contenait en même temps beaucoup de sucre; mais il est probable que cet état de l'urine n'avait pas de rapport avec la maladie qui nous occupe.

L'examen du sang donne l'explication de l'anémie progres-

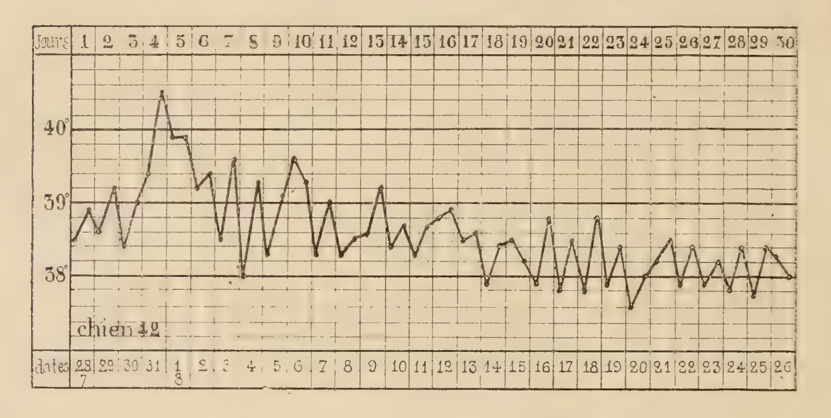


Fig. 4. Forme chronique. Injection intraveineuse.

sive des malades : le nombre des globules rouges s'abaisse peu à peu jusqu'au-dessous de 2,000,000; dans un cas (n° 61) il n'en existait plus que 1,200,000 par millimètre cube. L'hypoglobulie s'accuse surtout après la chute de la fièvre, et elle augmente encore après que les parasites semblent avoir disparu ou sont devenus très rares; après 25 à 30 jours, le nombre des globules augmente peu à peu, mais ce n'est guère avant 2 ou 3 mois qu'il est revenu au chiffre normal.

La perte en hémoglobine est beaucoup moins accusée que dans la forme grave, où elle peut tomber à 3 1/2 0/0; dans un cas où le nombre des globules n'était que de 2,760,000, il existait encore 9 1/2 0/0 d'hémoglobine.

Sur les préparations colorées, on observe, mieux encore que dans la forme grave, de grandes différences dans les

dimensions et la coloration des hématies; certaines ont 2 et 3 fois le diamètre normal, et se colorent d'une façon moins intense; on observe aussi, surtout au début de l'hypoglobulie, beaucoup d'hématies nucléées.

Le nombre des globules blancs est toujours très élevé, de 15 à 30,000; dans un cas (nº 61) nous en avons compté jusqu'à 54,000. L'hyperleucocytose porte également sur les mono- et les polynucléaires. Il est fréquent d'observer, dans les quelques jours qui suivent la période fébrile (quand elle existe), des leucocytes bourrés de globules rouges parasités; cette phagocytose, très rare dans la forme grave de la maladie, est exclusivement mononucléaire.

A mesure que la guérison s'affirme, le nombre des globules rouges augmente, celui des globules blancs diminue, on ne trouve plus que de rares globules rouges nucléés; en revanche, on observe de nombreux amas d'hématoblastes.

LE PARASITE

Quelle que soit la forme de la maladie, l'examen du sang permet d'y constater la présence d'un hématozoaire endoglobulaire, très proche parent de celui qui cause la fièvre du Texas.

Très abondant dans les formes rapides de la maladie, il est parfois, dans les formes lentes, très difficile à mettre en évidence; on y parvient cependant en examinant systématiquement le sang de la circulation capillaire, plusieurs jours de suite, s'il est besoin.

La recherche du parasite, en vue du diagnostic, est des plus simples; on dépose sur une lame bien propre une très petite gouttelette de sang obtenue par piqûre de la peau de l'oreille; on l'étale en couche aussi mince que possible à l'aide d'une autre lame dont on fait glisser le bord *rodé* sur le plat de la première; on sèche rapidement à l'air; on fixe par l'alcool-éther ou par l'alcool absolu; puis, quand le fixateur est complètement et spontanément évaporé, on dépose à la surface de la lame quelques gouttes de la thionine phéniquée de Nicolle. Si la thionine est bonne, un contact de 30 secondes est suffisant; on lave, on sèche, et on examine à un grossissement de 500 à 600 diamètres. Les hématies sont colorées en vert pâle; les parasites se mon-

trent sous forme de petits corps accusés par un contour très net fortement coloré en bleu, avec une partie centrale incolore ou d'un bleu très pâle. (Pl. V, fig. 1.)

La plupart des globules infectés ne contiennent qu'un parasite, volumineux et de forme ronde; mais on trouve aussi, surtout dans la forme rapide, des globules qui renferment 2, 4, 6, 8, 12 et jusqu'à 16 parasites; ils sont alors plus petits, irréguliers dans leur contour, polyédriques, ou parfois, mais rarement, pyriformes.

Le nombre des globules parasités est très variable suivant la forme de la maladie et, dans chaque forme, suivant la période de l'évolution. Dans les formes aiguës, pendant la fièvre ou aussitôt après, qu'il y ait ou non crise hémoglobinurique, les parasites sont en quantité considérable. Dans les formes lentes, ils sont si rares qu'ils peuvent échapper aux recherches de l'observateur le plus habile.

Dans ces cas difficiles, l'examen de la préparation doit porter sur le point où se termine la couche de sang étalé. C'est là que l'on a le plus de chances de voir des parasites si le sang en renferme. C'est donc une bonne précaution de ne déposer sur la lame qu'une très petite gouttelette de sang, de façon que la couche très mince qu'elle va former après étalage ne s'étende pas jusqu'à l'extrémité de la lame.

Si l'on veut étudier la structure et l'évolution du parasite, il faut recourir à des procédés de coloration plus complexes et y joindre l'examen du sang à l'état frais.

Les procédés de coloration de Romanowski, Vasielewski et surtout celui de Laveran donnent de bons résultats; mais ils sont d'un maniement délicat et, souvent, ils laissent à la surface de la préparation des précipités de matière colorante qui nuisent à la netteté des figures et peuvent prêter à la confusion.

Après beaucoup de tâtonnements, nous avons réussi à obtenir d'excellents résultats du procédé ci-après qui n'est d'ailleurs qu'une modification de celui de M. Laveran.

Les lames, préparées comme il est dit ci-dessus, sont fixées par immersion dans l'alcool absolu pendant 1 heure au moins; après évaporation complète et spontanée de l'alcool, on les dépose, la face enduite en dessous à la surface d'une mince couche de matière colorante obtenue ainsi qu'il suit :

Eosine d'Hœchst (marque extra B. A.) solution à 0,5 pour mille : 10 c. c.
Thionine phéniquée de Nicolle, 1 c. c.
Bleu Borrel à l'oxyde d'argent, 1 sol. sat. 2 gouttes.

Ces 3 solutions doivent être filtrées avant d'être mélangées, mais il ne faut pas filtrer le mélange.

Les préparations déposées à la surface du liquide colorant (sans que la face de la lame soit au contact du fond du récipient) y séjournent pendant 4 heures au moins; il n'y a pas d'inconvénients à les y laisser pendant 12-24 heures.

Après ce temps, on les lave copieusement sous un courant d'eau; puis on les traite, pendant 30 secondes à 1 minute, par le tannin orange de Grübler qu'on y laisse tomber goutte à goutte. On lave de nouveau, on sèche et on monte dans le baume. L'action du tannin orange est précieuse, non pas seulement parce qu'il différencie nettement l'hématie du parasite qu'elle renferme, mais surtout parce qu'il semble détacher et faciliter l'entraînement des précipités de matière colorante qui avaient pu se déposer sur la préparation.

Les préparations ainsi colorées facilitent beaucoup l'étude du parasite. Tandis que son protoplasma est coloré en bleu pâle, son noyau a pris une teinte rouge carmin très intense ; le tout tranche de la façon la plus nette sur la coloration orange des globules rouges.

Le même procédé de coloration donne d'excellents résultats pour l'étude des tissus; les coupes (obtenues après fixation au sublimé acide, durcissement dans la série des alcools, et enrobage dans la paraffine) sont fixées sur lame, traitées pendant 15 à 20 minutes par le mélange colorant ci-dessus, lavées sous un courant d'eau, soumises pendant 10 à 15 secondes à l'action du tannin orange, lavées de nouveau, déshydratées par l'alcool absolu, éclaircies par le toluène ou le xylol et montées au baume. Les préparations ainsi obtenues sont d'une admirable netteté.

Le procédé est également applicable à l'étude des trypanosomes (du rat, de la dourine ou du nagana) ; il donne les mêmes résultats excellents.

L'examen du sang à l'état frais permet de se rendre compte des changements de forme du parasite sous l'influence des mouvements amœboïdes qu'il exécute à l'intérieur des globules. Cet examen ne donne de résultats vraiment utiles qu'à la période fébrile, ou aussitôt après la chute de la température. C'est seulement à ce moment que de nombreux parasites sont doués de mouvements et qu'ils se multiplient activement.

Pour être fructueux, cet examen doit être fait à la chambre chaude et porter sur un mélange *ââ* de sang et d'humeur aqueuse ou de liquide physiologique, déposé en goutte suspendue à la face inférieure d'une lamelle reposant sur une lame creuse.

L'emploi d'un objectif à sec (n° 9 de Verick) sans éclairage Abbé est préférable; on peut cependant utiliser aussi les objec-

tifs à immersion homogène avec éclairage Abbé, à la condition de diaphragmer fortement.

Les globules infectés sont plus grands, plus pâles que les autres; l'hématozoaire apparaît comme une petite masse irrégulièrement arrondie, dont le contour est très foncé et le centre fortement réfringent.

Dans la chambre chaude, on voit aisément le parasite changer de forme; son contour devient irrégulier; des prolongements se forment qui se dirigent en s'effilant vers la périphérie du globule, puis se contractent pour se réunir de nouveau à la masse centrale du parasite; assez souvent, on observe ainsi 2 ou 3 pseudopodes procédant manifestement du parasite; ces mouvements sont parfois assez rapides pour faire pirouetter sur lui-même le globule infecté.

En d'autres cas, où le parasite semble contracté en une masse globuleuse, immobile au centre de l'hématie, on voit de très petits corpuscules très réfringents et doués de mouvements très vifs, qui semblent tourbillonner autour de lui. Nous ignorons la nature et la signification de ces granulations.

Très vite après la période fébrile, les hématozoaires semblent perdre leurs propriétés amœboïdes; ils restent immobiles au centre du globule infecté sous forme d'une masse arrondie.

Il existe parfois dans le plasma des parasites en liberté, soit parce qu'ils ont réussi à sortir du globule, soit plutôt parce que le globule qui les renfermait a été détruit, L'examen à l'état frais permet difficilement de les distinguer des granulations protéiques, débris cellulaires ou autres qui sont en suspension dans le plasma. On y réussit pourtanl en diluant le sang à examiner dans du liquide physiologique légèrement teinté de bleu de méthylène; les parasites prennent une légère coloration bleue qui permet de les différencier du protoplasma globulaire ou de ses débris demeurés incolores.

Ce procédé facilite aussi l'étude du parasite intra-globulaire, qui se colore légèrement sans cesser de se mouvoir. Ces résultats de l'examen à l'état frais donnent l'explication de la grande diversité de formes qu'affecte le parasite sur les *préparations colorées*.

Au début de la maladie, on n'observe en général qu'un seul parasite dans chaque globule infecté; il est volumineux et

arrondi ; un peu plus tard les globules parasités sont plus nombreux et beaucoup contiennent plusieurs parasites.

C'est alors que l'on peut observer des hématozoaires pyriformes, soudés ou non par leur extrémité effilée ; mais la forme en poire est toujours très rare.

Vers la fin de la période fébrile, ou tout aussitôt après, apparaissent les formes amœboïdes les plus variées ; les hématozoaires sont polyédriques, ou allongés, ou comme ramifiés : leur contour est hérissé d'aspérités, de pseudopodes parfois très fins et simulant des flagelles ondulés ou contournés (fig. 5).

Dans les formes lentes, après la période fébrile, les parasites, irrégulièrement arrondis, semblent plus petits ; il est rare qu'on en trouve plusieurs dans le même globule.

Les préparations faites, aussitôt après la mort, avec le sang des capillaires des parenchymes, montrent un nombre plus considérable de globules infectés ; les parasites y sont aussi plus petits que dans le sang de la circulation générale et presque tous ronds.

Le volume de l'hématozoaire ne varie pas seulement suivant la période de la maladie, mais aussi suivant l'âge du malade ; il est plus gros chez les très jeunes chiens, au point d'occuper parfois plus de la moitié de la surface globulaire ; chez les adultes, il est beaucoup plus petit et, vers la fin de la maladie, on le croirait réduit à son noyau autour duquel le protoplasma condensé ne forme plus qu'une sorte de mince couronne.

Les parasites libres paraissent plus volumineux que ceux qui sont intraglobulaires.

Le parasite est constitué par une masse protoplasmique pourvue d'un noyau (caryosôme ou centrosôme).

La matière protoplasmique paraît condensée à la périphérie qui fixe fortement les matières colorantes et simule une membrane d'enveloppe ; la partie centrale hyaline ne renferme aucune granulation colorable par les méthodes usitées.

Le noyau préside aux phénomènes de multiplication du parasite ; notre méthode de coloration le colore fortement en rouge carmin, tandis qu'elle colore en bleu le protoplasma.

La forme et la situation du noyau varient beaucoup ; pendant la période fébrile, les parasites, de forme ronde, ont leur

noyau allongé et excentrique ; il longe le bord de l'hématozoaire sur une étendue égale au 1/5e environ de son contour.

Dans le sang des parenchymes, toujours plus riche en hématozaires que celui de la circulation générale, le parasite est plus petit et affecte surtout la forme ronde; le noyau en occupe le centre ; à son voisinage immédiat le protoplasma semble raréfié, Il s'y colore moins qu'à la périphérie. Cet aspect particulier s'observe, identique, dans le sang de la circulation générale prélevé après la mort ou dans le sang recueilli avant la mort, mais conservé depuis quelques jours à la cave.

La multiplication de l'hématozoaire se fait par division directe (bipartition). C'est pendant la période fébrile qu'elle est la plus active. Le sang de la circulation générale n'est pas favorable pour l'étude de ces phénomènes; la division s'y fait trop vite, d'une façon irrégulière, désordonnée si l'on peut dire, (fig. 6). Au contraire, dans le sang des capillaires des organes (foie, reins, moelle osseuse), la division se fait lentement, régulièrement, et l'on peut y suivre toutes ses phases (fig. 7).

A l'état normal ou « de repos », l'hématozoaire est rond et le noyau, également arrondi, en occupe le centre (1). Quand le parasite est sur le point de se diviser, le noyau s'allonge en même temps qu'il s'éloigne du centre et gagne la périphérie de la masse protoplasmique (2); puis, à mesure que le noyau s'allonge, il s'étrangle en son milieu et bientôt la division s'achève (3). Les 2 noyaux ainsi formés s'éloignent ensuite l'un de l'autre en longeant le contour du parasite, jusqu'à ce qu'ils en occupent les pôles opposés (4.5,6); en même temps le protoplasma se condense le long d'une ligne équatoriale, en sorte que chaque noyau semble occuper le centre d'une zone incolore où le protoplasma se raréfie de plus en plus (7). Bientôt une échancrure apparaît aux deux extrémités de la zone condensée (8) et, peu à peu, comme sous un effort de traction en sens inverse opérée par les 2 noyaux, les échancrures augmentent de profondeur au point de n'être plus séparées que par une mince bande de matière protoplasmique, qui maintient encore unis les 2 nouveaux parasites, allongés en forme de poires (9.10.11); à ce moment les noyaux, jusque-là situés à la périphérie de l'organe, se rapprochent du centre en s'arrondissant peu à peu. Une fois

la séparation achevée, le protoplasma reprend la forme globuleuse qui semble bien être l'état normal du parasite.

Les parasites nouveaux se multiplient ensuite, suivant le même processus, dans le même globule qui peut contenir 4, puis 8 et jusqu'à 16 hématozoaires.

Le globule ainsi distendu augmente de volume, puis il éclate en quelque sorte, laissant en liberté dans le plasma les parasites néoformés, lesquels, grâce à leurs mouvements amœboïdes, vont infecter de nouveaux globules, à moins qu'ils ne soient englobés et détruits par quelque phagocyte.

Il paraît arriver que l'un des hématozoaires ainsi formés à l'intérieur de l'hématie ne se multiplie pas à son tour ou ne se divise que tardivement. C'est ce qui explique qu'on peut trouver des globules renfermant 3, 6 ou 12 parasites. Mais dans l'immense majorité des cas, quand un globule renferme plusieurs parasites, ils sont en nombre pair.

On rencontre parfois des hématozaires qui montrent sur leur contour de petites saillies arrondies, colorées comme le noyau en rouge carmin, comme si le parasite pouvait aussi se multiplier par bourgeonnement. Mais le fait est très rare et nous ne l'avons jamais constaté sur des préparations fraîches.

Les parasites sont toujours beaucoup plus nombreux dans le sang des capillaires des parenchymes que dans le sang du cœur ; c'est le rein qui renferme le plus de globules infectés, et c'est aussi dans le rein que le nombre des parasites contenus dans chaque globule est le plus considérable. Il est fréquent d'y voir des hématies renfermant 12, 14, 16 et 18 parasites (fig. 3).

Viennent ensuite, par ordre de fréquence, la rate, le foie (fig. 2) la moelle osseuse, le poumon, le cœur, les ganglions, la muqueuse intestinale et les centres nerveux (fig. 9).

ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Les lésions sont d'autant plus accusées que la maladie a duré plus longtemps. Souvent le cadavre est ictérique ; la teinte jaune, plus ou moins intense, peut aller jusqu'au jaune de chrome.

La rate est souvent hypertrophiée ; elle a parfois 3 ou 4 fois

le volume normal et elle s'étend alors le long de l'hypochondre jusque sur le sternum. Sa couleur, plus foncée, rougit au contact de l'air; sa consistance diminue, sans aller jusqu'au ramollissement; dans les formes rapides, ces modifications font défaut; en revanche les préparations obtenues par frottis sont très riches en hématozoaires.

Le foie, ordinairement gorgé de sang, est peu modifié en apparence; il a parfois l'aspect du foie cardiaque; le sang qui s'écoule d'une section est toujours très chargé en globules parasités. La vésicule biliaire, d'ordinaire distendue, renferme une bile épaisse, sirupeuse ou grumeleuse, de couleur vert foncé.

La muqueuse digestive est rarement infiltrée et congestionnée au niveau du duodénum.

Les reins sont le plus souvent congestionnés à l'extrême; la capsule se détache aisément, laissant voir un grand nombre de taches pétéchiales de dimensions variables; sur la coupe, la couche corticale paraît gorgée de sang et couverte d'un fin piqueté hémorragique. Le sang qui s'en écoule est extrêmement riche en parasites.

Les *poumons* sont souvent parsemés de petits foyers apoplectiques; chez les tout jeunes animaux qui meurent si rapidement, c'est presque la règle d'observer de l'œdème aigu du poumon, avec des spumosités abondantes et légèrement rougeâtres, dans les bronches et la trachée.

Le *péricarde* renferme un peu de sérosité sanguinolente ou citrine; il n'est pas rare de voir de nombreuses taches pétéchiales, vers la pointe du cœur ou sous l'endocarde du cœur gauche.

Les *ganglions* lymphatiques sont rarement altérés.

La *moelle osseuse* est presque toujours le siège d'une congestion intense qui lui donne l'aspect fœtal; elle est molle, friable et renferme un grand nombre de globules parasités.

Les centres nerveux ne présentent rien d'appréciable, sauf un peu de congestion des méninges.

On retrouve à l'autopsie toutes les modifications du sang sur lesquelles nous avons déjà insisté; le cœur et les gros vaisseaux renferment des caillots peu consistants, formés presque entièrement de fibrine, baignant dans un sérum rougeâtre fortement chargé d'hémoglobine.

L'étude histologique des organes montre que toutes ces lésions procèdent de l'extrême distension du réseau capillaire par des amas de globules dont la plupart sont gorgés de parasites.

PRODUITS VIRULENTS. — MODES D'INOCULATION. — INCUBATION. — RÉSISTANCE DU VIRUS.

Le parasite existe dans le sang; tous les tissus vasculaires peuvent donc donner la maladie. C'est surtout le sang que nous avons utilisé dans nos recherches; l'inoculation sous-cutanée, intra-musculaire ou intra-veineuse donne la maladie sous l'une ou l'autre forme, pourvu que le sang inoculé renferme des parasites : l'injection dans les veines est le procédé le plus rapide et le plus sûr.

Plus le sang inoculé est riche en parasites, plus jeune est le chien inoculé, plus grave aussi sera la maladie provoquée et plus rapide son évolution.

Chez les tout jeunes chiens, il suffit d'une goutte de sang riche pour donner une maladie mortelle; il faut en injecter un cent. cube aux chiens adultes pour les rendre malades.

Dans la forme lente de la maladie, le sang est beaucoup moins virulent que dans la forme aiguë, abstraction faite de la quantité de parasites qu'il renferme; inoculé même à haute dose, il ne donne ordinairement qu'une maladie bénigne. Dans l'une de nos séries d'expériences, le virus initial provenait d'un chien en voie de guérison, dont le sang contenait encore des parasites; tous les chiens de cette série ont eu la forme bénigne de la maladie, aucun n'est mort.

Quels que soient la quantité de sang inoculée, sa richesse en parasites et le mode d'inoculation, il se passe toujours un certain temps avant l'apparition des premiers symptômes; si l'on examine systématiquement le sang de la circulation générale, on n'y voit guère de globules parasités avant la 36e heure; en règle générale, ce n'est qu'après 2 jours pleins que les parasites apparaissent, même au cas d'injection intraveineuse. Si l'inoculation a été pratiquée dans les muscles ou sous la peau, l'incubation est de 5 à 6 jours. Dans les cas aigus, la mort survient en moyenne 3 jours après l'apparition des parasites;

les très jeunes chiens meurent encore plus vite, 36 à 40 heures après. Si donc l'inoculation a été faite dans les veines, l'animal meurt, en général, le 4e ou le 5e jour; s'il a été inoculé sous la peau, il peut survivre 9, 10 ou 11 jours. Quand la maladie provoquée revêt la forme lente, sa durée est très variable; l'animal peut rester malade 30, 40 et jusqu'à 60 jours.

Le sang recueilli purement, conservé à la cave et à l'abri de la lumière, est encore virulent après 25 jours en hiver; en été, nous l'avons trouvé inactif après 14 jours.

Le sang perd sa virulence quand il est chauffé à 50° pendant 1/2 heure, à 45° pendant 1 heure, à 44° pendant 1 h. 1/4; il est encore virulent après 1 h. 1/2 de chauffage à 43°.

ÉTIOLOGIE

Rien n'est plus solidement établi que le rôle de la tique dans le développement de la piroplasmose bovine. Les belles recherches expérimentales de Smith et Kilborne, confirmés par celles de Pound, de Koch et de Lignières ont démontré que, pour provoquer la fièvre du Texas, la Tickfever, la Red-Water ou la Tristeza, il suffit de déposer à la surface du corps de bovidés adultes, provenant de pays non infectés, des larves nées de tiques (*Ripicephalus annulatus*) ayant vécu sur des bovidés malades. Depuis, partout où l'on a observé la même maladie (et son aire géographique est immense), on a pu établir une étroite relation de cause à effet entre l'apparition de l'hémoglominurie et la présence de tiques sur la peau des malades.

La grande analogie qui existe entre les symptômes de la piroplasmose, qu'il s'agisse du chien ou du bœuf, et surtout la presque identité de l'hématozoaire dans les deux espèces, devait faire penser à une étiologie de même nature.

Dans toutes les observations recueillies à Alfort, les chiens malades avaient été récemment couverts de tiques; quelques-uns en portaient encore. Toutes celles que nous avons eues entre les mains appartenaient à l'espèce *Dermacentor reticulatus*.

Il est bien probable que cette espèce est l'agent ordinaire de la transmission de la maladie, au moins en France[1]. Nous ne

1. La piroplasmose du chien de l'Afrique du Sud (jaunisse maligne) semble due à un ixode différent, que le Prof. Neumann de Toulouse a reconnu être l'*Hæmaphysalis lœchi* Audouin.

pouvons pourtant pas l'affirmer, car nous n'avons pas réussi à infecter des chiens en les couvrant de larves obtenues de tiques femelles recueillies sur nos malades[1].

Dans presque tous les cas connus, il s'agissait de chiens de chasse qui avaient récemment chassé sur des terrains boisés ou broussailleux ou qui avaient séjourné dans des chenils infestés de tiques.

Contrairement à ce qu'on observe pour la piroplasmose bovine, les tout jeunes chiens (de 2 à 12 semaines) sont beaucoup plus facilement infectés que les adultes et, chez eux, la maladie revêt une forme suraiguë, toujours mortelle.

Spécificité du parasite. — Morphologiquement, l'hématozoaire du chien est identique à celui du bœuf. Pourtant il ne peut se développer que dans l'organisme du chien. Il nous a été impossible de donner la maladie, ou même de constater l'existence du parasite dans les globules d'un animal d'une autre espèce, quelque fussent le procédé d'inoculation employé (sous-cutanée, intra-musculaire, intra-veineuse), la quantité du sang inoculé, et sa richesse en parasites ; bœuf, cheval, mouton, chèvre, chat, lapin, cobaye, rat blanc, souris blanche, poule et pigeon se sont montrés complètement réfractaires.

ESSAIS DE CULTURE DU PARASITE

Toutes nos tentatives de culture artificielle de l'hématozoaire du chien sont restées infructueuses.

Le sang de chien défibriné, le sérum très chargé d'hémoglobine, le sang rendu incoagulable par l'injection d'extrait de sangsue dans les vaisseaux d'un chien neuf n'ont pas donné de meilleurs résultats que les milieux habituels.

1. Le très intéressant mémoire de Lounsbury donne l'explication de nos échecs réitérés : tandis que les larves du *Ripicephalus annulatus* peuvent accomplir toute leur évolution sur le même bovidé, celles de l'*Hœmaphysalis bachi* abandonnent le chien qui les hébergeait provisoirement, à la veille de chaque mue; la mue achevée sur le sol ou sur la litière, la nymphe et la tique adulte doivent retrouver un nouvel hôte, pour se préparer soit à la mue prochaine, soit à la ponte; de plus, il semble que ni les larves ni les nymphes n'aient le pouvoir de donner la maladie; seules les tiques adultes seraient réellement pathogènes.

Il est probable que le *Dermacentor reticulatus* se comporte tout comme l'*Hœmaphysalis;* car après avoir vu grossir peu à peu les larves déposées sur la peau de nos chiens d'expérience, nous les voyions disparaître tout à coup avant d'être passées à l'état de nymphe, et elles se perdaient dans la litière.

Si l'on met à l'étuve à 37° du sang défibriné très riche en parasites, on observe parfois une phagocytose intense des globules infectés (fig.8); on voit aussi les parasites subir de profondes transformations; on ne les voit jamais se multiplier. Quelle que soit leur forme initiale, rapidement ils deviennent globuleux, arrondis; leur noyau devient central; puis, par une sorte de condensation ou de contraction du protoplasme, ils diminuent de volume au point de paraître bientôt réduits au noyau.

Les mêmes transformations s'opèrent aussi dans le sang conservé à la température de la chambre; mais elles se font beaucoup plus lentement, en sorte qu'il est possible d'en suivre exactement toutes les phases. Déjà, après 5 à 6 jours, les parasites ont considérablement diminué de volume et semblent réduits au noyau entouré d'une mince couche de protoplasma à peine coloré en bleu très pâle, tandis que le noyau est coloré d'une façon intense en rouge carmin (fig. *a*).

Après quelques semaines, les hématies sont très altérées; elles semblent avoir perdu la plus grande partie de leur hémoglobine, elles prennent très mal les matières colorantes et l'on distingue à peine leur contour; souvent même il semble qu'elles se soient soudées les unes aux autres pour constituer une nappe homogène, uniformément teintée en orange très pâle, au milieu de laquelle les parasites, colorés en rouge intense et réduits à leur noyau, auréolé d'une très mince couche de protoplasma à peine visible, sont disséminés en grand nombre et peuvent donner l'illusion d'une culture (fig. 4, *b*).

Nous avons fait sucer par des sangsues le sang de chiens malades, sang très riche en parasites; les sangsues maintenues à l'étuve à 22° dans de l'eau renouvelée chaque jour nous ont permis d'examiner jour par jour les modifications qui surviennent dans le sang ainsi recueilli; on n'y observe rien de plus que ce que nous avons décrit plus haut : déjà, après 15 heures, les parasites, toujours volumineux, ont pris la forme globuleuse; mais ils semblent avoir perdu tout mouvement amoeboïde; les globules rouges sont pâles et tendent à s'agglutiner; les jours suivants on voit les parasites diminuer peu à peu de volume; au bout d'une semaine, ils semblent réduits à leur noyau et sont disséminés dans une sorte de stroma informe résultant de l'agglutination et de la fusion des globules rouges; leur

nombre n'a pas augmenté ; ces altérations persistent identiques jusqu'à la mort de la sangsue qui survient du 15e au 20e jour.

Il semble donc bien que l'hématozoaire ne peut se multiplier que dans un milieu vivant et approprié.

IMMUNITÉ CONSÉCUTIVE A LA GUÉRISON.

Tout chien guéri de la maladie naturelle ou expérimentale est désormais réfractaire ; il supporte impunément l'injection de sang virulent à des doses bien supérieures à celles qui sont toujours mortelles pour les témoins.

Exemples : *Chien n°* 1, guéri de la maladie expérimentale. Après 2 mois 1/2, alors que les globules rouges étaient revenus au chiffre de 5.740,000, on lui injecte sous la peau 20 c. c. d'un sang dont 3 c. c. tuent en 7 jours le chien témoin. L'examen du sang pratiqué chaque jour, pendant 25 jours, n'a jamais montré d'hématozoaire; la courbe thermique n'a pas subi d'élévation.

Chien n° 5; réinoculé 3 mois après guérison, par injection intraveineuse de 12 c. c. de sang virulent. Le sang examiné chaque jour n'a montré de très rares parasites qu'une seule fois, le 15e jour; l'animal n'a jamais paru malade; sa température est restée normale.

Chien n° 8 (de petite taille); réinoculé, 6 mois après guérison, par injection sous-cutanée de 5 c. c. de sang très riche en parasites; sa température s'est élevée le 8e jour à 39° ; mais il n'a jamais présenté d'hématozoaires. Le même chien a reçu depuis, en plusieurs fois, 72 c. c. de sang virulent, sans avoir jamais eu de parasites.

Chien n° 12; reçoit 2 mois 1/2 après guérison 10 c. c. de sang virulent dans la veine, et 5 c. c. sous la peau; sa température est restée normale; on a vu de très rares parasites dans son sang les 2e, 3e et 5e jours après l'inoculation; puis, plus rien.

Chien n° 80, guéri d'une atteinte très grave de la maladie; reçoit, 2 mois après, 15 c. c. de sang très riche en parasites, dans la jugulaire, et 5 c. c. sous la peau; n'a jamais présenté ni fièvre ni parasites.

Dans tous ces cas, les chiens témoins inoculés en même temps et de la même façon, avec des doses bien inférieures du même virus, ont succombé en 7-9 jours, ou en 3-5 jours, suivant le mode d'inoculation.

On voit que l'immunité conférée par une première atteinte suivie de guérison est à la fois solide et durable. Le chien n° 8 était encore réfractaire 6 mois après la guérison.

Quel est le mécanisme de l'immunité ?

Nous avons déjà dit que, dans le sang des malades, surtout de ceux qui sont en voie de guérison, il se produit une active phagocytose. Il est fréquent d'observer de gros mononucléaires

ayant englobé 2, 3, 4 et jusqu'à 6 globules rouges tous infectés; de ces globules, les uns ont déjà perdu toute leur hémoglobine, d'autres se colorent presque aussi bien que les globules normaux; entre ces deux extrêmes, on peut voir tous les stades intermédiaires: les premiers ont leurs parasites arrondis, très petits, à peine colorés, avec un contour mal dessiné; dans les autres, les parasites, également petits et ronds, sont fortement teintés, et leur contour est nettement accusé.

Cette phagocytose s'opère également dans la profondeur des organes; on l'observe très active sur les coupes de la rate, même chez des chiens qui ont succombé à la forme aiguë de la maladie. Dans chaque champ on peut voir des mononucléaires bourrés de globules parasités en voie de digestion; parfois les globules phagocytés sont si nombreux que les phagocytes donnent l'illusion d'un capillaire sectionné en travers. (La figure 8 montre plusieurs types de phagocytes de la rate diversement colorés.)

Ce sont toujours les mononucléaires qui englobent les hématies infectées; nous n'avons jamais vu un seul globule phagocyté par un polynucléaire; il est pourtant probable que les polynucléaires contribuent aussi à la défense en englobant les parasites libres dans le plasma; mais nous n'avons pas constaté le fait d'une façon certaine.

ACTION BACTÉRICIDE DU SÉRUM DES ANIMAUX IMMUNISÉS

Lorsqu'on mélange *in vitro* 1 volume de sang virulent avec 3, 4 ou 5 volumes de sérum d'un chien guéri de la maladie, le mélange peut être inoculé impunément à des chiens neufs, même par la voie veineuse. Ces chiens restent bien portants, et, à aucun moment, leur sang ne renferme de parasites.

Ces chiens sont-ils ainsi rendus réfractaires à la maladie? Non. Reinoculés 12-15 jours après, avec une petite dose de sang virulent, ils deviennent malades et succombent aussi rapidement que les témoins.

On pourrait croire à une action préventive de très courte durée. Il n'en est rien. Si l'on inocule le sérum en un point et le sang en un autre point, le chien inoculé prend la maladie, tout comme le témoin, même quand le sérum est injecté 12 ou 24 heures avant le sang virulent. Il s'agit donc, en réalité, d'une action microbicide du sérum.

Cette action ne s'exerce pas quand le sérum a été chauffé à 56°-57° pendant 1/2 heure, tandis que, nous le verrons plus loin, on peut obtenir des sérums préventifs qui gardent leur action préventive après chauffage à 56°-57° pendant 1 heure.

L'action microbicide du sérum s'observe beaucoup plus accusée chez les chiens fortement immunisés par injections répétées du sang virulent.

Expériences. — *Chien n°* 26, âgé de 3 mois; inoculé sous la peau avec un mélange de 50 gouttes de sérum du chien n° 20 (guéri depuis un mois) et 20 gouttes de sang virulent, après 1 h. 1/2 de contact.

L'examen du sang pratiqué chaque jour, pendant 11 jours, n'a jamais montré de parasites.

A l'épreuve (2 c. c. de sang virulent sous la peau) le chien prend la maladie et meurt, comme le témoin, le 5e jour.

Chien n° 68, âgé de 15 jours; reçoit sous la peau un mélange de 50 gouttes de sérum du chien 39 (guéri depuis 6 semaines) et de 10 gouttes de sang virulent, après 1 h. 1/2 de contact. Le sang examiné pendant 11 jours n'a jamais montré de parasites. Le témoin chien n° 70, inoculé par 10 gouttes du même sang pur, a pris la maladie à laquelle il a succombé le 6e jour.

Chien n° 77, adulte; reçoit sous la peau un mélange de 50 gouttes de sérum du chien n° 50, et de 20 gouttes de sang virulent, après 1 heure de contact; son sang examiné pendant 11 jours ne renferme pas de parasites. Le témoin n° 83, inoculé sous la peau par 10 gouttes du même sang pur, meurt le 6e jour. — Réinoculé avec 1/2 c. c. de sang virulent, le chien 77 prend la maladie et meurt le 7e jour.

Chien n° 90, 15 jours; reçoit sous la peau un mélange de 20 gouttes de virus et de 20 gouttes de sérum du chien n° 8 *hyperimmunisé*, après 1 h. 1/2 de contact; pendant 11 jours, le sang ne montre pas de parasites. Le témoin, n° 91, inoculé le même jour et de la même façon, par un mélange de 1 c. c. de virus et de 1 c. c. de sérum de mouton préparé, meurt après 6 jours.

Chien n° 124, 15 jours; reçoit sous la peau un mélange de 10 gouttes de sang virulent et de 25 gouttes de sérum renforcé de chien n° 8. Son sang n'a jamais présenté de parasites. Le témoin n° 123, inoculé par 10 gouttes du même sang, est mort le 5e jour.

L'action bactéricide du sérum est bien due à l'état réfractaire du chien qui l'a fourni, car le sérum de chien sain n'est pas bactéricide.

Expérience. — *Chien n°* 101, 15 jours; reçoit sous la peau un mélange de 50 gouttes de sérum de chien normal et de 10 gouttes de sang virulent, après 1 h. 1/2 de contact; ce chien a des hématozoaires dès le 4e jour; il meurt le 5e jour après l'inoculation.

L'action bactéricide du sérum n'appartient pas seulement

aux chiens guéris de la maladie; on peut aussi l'observer chez les animaux spécifiquement réfractaires auxquels on a fait des injections répétées de sang virulent.

Un mouton south-down reçoit en 12 injections sous-cutanées ou intraveineuses, du 24 avril au 9 novembre 1901, 290 c. c. de sang de chien très riche en parasites. A part de faibles oscillations de la température survenant le soir ou le lendemain des injections, ce mouton n'a jamais présenté le moindre malaise; jamais on n'a pu voir d'hématozoaire dans son sang. Le nombre de ses globules rouges n'a pas sensiblement varié [1]. Le sérum de ce mouton s'est montré nettement bactéricide, quoique à un degré notablement moindre que le sérum des chiens guéris et surtout des chiens dont l'immunité avait été renforcé par des injections répétées de sang virulent.

Expériences. — *Chien n°* 91, 15 jours; reçoit sous la peau un mélange de 1 c. c. de sérum de mouton préparé et de 1 c. c. de sang virulent, après 1 h. 1/2 de contact, meurt infecté après 6 jours.

Chien n° 66, 15 jours; reçoit sous la peau un mélange de 50 gouttes de sérum et de 10 gouttes de sang virulent, après une heure de contact. — N'a présenté pendant 13 jours aucun hématozoaire. — Réinoculé sous la peau, le 14e jour, avec 1/2 c. c. de sang virulent, a pris la maladie et a succombé le 3e jour.

Chien n° 69, 15 jours; reçoit sous la peau de la cuisse gauche 50 gouttes de sérum et sous la peau de la cuisse droite 10 gouttes du même sang virulent. — Prend la maladie et meurt après 6 jours.

Chien n° 67, 15 jours (*témoin*). Reçoit sous la peau un mélange de 50 gouttes de sérum de mouton *normal* et de 10 gouttes de même sang virulent. — Prend la maladie et meurt le 6e jour.

Chien n° 70, 15 jours (*témoin*). — Reçoit sous la peau 10 gouttes du même sang virulent *pur*. Prend la maladie et meurt le 6e jour.

Chien n° 79, 15 jours. — Reçoit sous la peau un mélange de 50 gouttes de sérum de mouton traité, chauffé à 56°-57°, et de 10 gouttes de sang virulent, après 2 heures de contact. Prend la maladie et meurt le 6e jour.

Le sérum de mouton traité par injections de sang virulent est très hémolytique *in vitro* pour le sang de chien; on pourrait croire que les parasites mis en liberté par l'hémolyse sont plus facilement englobés par les phagocytaires du chien inoculé; l'expérience ci-après prouve qu'il n'en est rien.

1. Une chèvre traitée de la même façon a également bien résisté; mais le nombre de ses globules est tombé de 13,600,000 à 6,580,000 par millimètre cube; il semble que le sang de chien ait une action hémolytique très accusée à l'égard du sang de la chèvre.

Chien nº 68, 15 jours. — Reçoit sous la peau un mélange de 10 gouttes de sang virulent et de 50 gouttes de sérum d'un mouton non traité (sérum rendu hémolytique par des injections répétées de sang de chien normal). Prend la maladie dès le 4e jour et meurt le 6e.

ACTION PRÉVENTIVE DU SÉRUM DES CHIENS IMMUNISÉS

Nous avons montré dans le paragraphe précédent que le sérum des chiens guéris est incapable, aux petites doses injectées, de prévenir ou de retarder notablement les effets mortels de l'inoculation d'épreuve. Les expériences ci-après montrent qu'injecté à doses plus élevées, le même sérum peut retarder notablement, ou même empêcher l'action mortelle du virus inoculé 24 ou 48 heures après.

Mais l'action préventive du sérum est bien plus nette s'il provient de chiens hyperimmunisés au moyen de grandes quantités de sang virulent.

1re SÉRIE. — *Sérum de chien immunisé.* — *Chien nº* 97, âgé de 15 jours; reçoit sous la peau 3 c. c. de sérum de chien nº 8 (qui a reçu, 6 mois après guérison, 30 c. c. de sang virulent); 30 heures après, on lui inocule sous la peau 1 c. c. de sang virulent. Nombreux parasites dès le 6e jour; meurt le 12e jour.

Chien nº 98, même portée; reçoit sous la peau 5 c. c. du même sérum; 30 heures après, inoculation sous-cutanée de 1 c. c. de sang virulent. Parasites dès le 5e jour; mort le 11e.

Chien nº 99, même portée (*témoin* des 2 précédents); inoculé sous la peau par 1 c. c. du même virus; parasites dès le 4e jour; mort le 7e.

Chien nº 94, âgé de 12 jours; reçoit sous la peau 10 c. c. du même sérum. Après 24 heures, on lui inocule sous la peau, en même temps qu'au chien nº 92, *témoin*, 1/2 c. c. de sang virulent. Le témoin meurt le 7e jour; l'autre ne montre de parasites que le 8e jour; il meurt le 13e jour.

Chien nº 87, âgé de 15 jours; reçoit sous la peau 13 1/2 c. c. du même sérum; après 48 heures, on lui inocule sous la peau, en même temps qu'à un *témoin*, nº 88 (adulte de petite taille), 1 c. c. de sang virulent. Le témoin meurt le 14e jour. Le chien nº 87 a présenté pendant plusieurs jours un petit nombre de globules parasités, activement phagocytés par de gros mononucléaires; mais sa température est restée normale et son état général satisfaisant; la guérison a été rapide et définitive.

Sérum de chien hyperimmunisé. — Dans nos 2e et 3e séries, nous avons utilisé le sérum du même chien nº 8, dont l'immunité a été renforcée par de nouvelles injections de sang virulent, portant à 52 c. c. la quantité totale du sang injecté.

Ce sérum a été préalablement chauffé à 56°-57° pendant une demi-heure.

2e SÉRIE. — *Chien n°* 102, âgé de 15 jours; reçoit sous la peau 5 c. c. de sérum.

Après 24 heures, on lui inocule — en même temps qu'à un chien *témoin* de la même portée, n° 106 — 3 gouttes de sang très riche en parasites.

Le témoin meurt le 6e *jour.*

Le n° 102 reste bien portant: son sang ne renferme pas de parasites.

Réinoculé le 19e jour avec 1 c. c. de sang virulent (en même temps que 2 témoins nos 93 et 110 qui meurent après 7 jours), il présente, dès le 5e jour, un petit nombre de parasites qui sont l'objet d'une phagocytose très active; mais il reste bien portant et survit.

Chien n° 103, même portée; reçoit sous la peau 3 c. c. de sérum chauffé. Après 24 heures, on lui inocule 3 gouttes du sang virulent (qui tue le témoin n° 106 en 6 jours). Son sang examiné pendant 10 jours ne présente pas d'hématozoaires.

Réinoculé le 11e jour avec 1 c. c. de sang virulent, il a des parasites 6 jours après; pendant une semaine environ, il montre tous les signes de la maladie, — tristesse, abattement, anémie globulaire. — Pourtant les parasites restent peu nombreux et sont l'objet d'une phagocytose active: enfin l'état général redevient bon et, 20 jours après la 2e inoculation, on peut le considérer comme guéri; le sang ne renferme plus de parasites.

Chien n° 104, même portée; reçoit sous la peau 5 c. c. du même sérum. Après 24 heures, on lui inocule 5 gouttes de sang très virulent dont 3 gouttes ont tué le *témoin* n° 106 en 6 jours. Son sang, examiné chaque jour pendant 32 jours, n'a jamais presenté de parasites. Réinoculé le 35e jour avec 10 gouttes de sang virulent qui tue le *témoin* n° 123 en 5 jours, il résiste tout en présentant quelques parasites le 10e jour.

Chienne n° 105, même portée; reçoit sous la peau 10 c. c. du même sérum. 24 heures après, on lui inocule 3 gouttes de sang (dont le *témoin* n° 106 a démontré la virulence). Examiné pendant 10 jours, son sang n'a pas montré de parasites. — Réinoculée le 11e jour avec 1 c. c. de sang virulent, il a montré dès le 5e jour des parasites peu nombreux et activement phagocytés; pourtant son état général devenait peu à peu moins bon, on observait de l'anémie progressive et la mort survenait le 18e jour après la 2e inoculation.

3e SÉRIE. — *Chiens nos* 119, 120, 122, âgés de 15 jours, reçoivent sous la peau 3 c. c. de sérum.

Après 24 heures, le n° 119 est inoculé sous la peau, avec 10 gouttes de sang très virulent.

Après 48 heures, même inoculation au chien n° 120.

Le n° 122 n'est inoculé qu'après 3 jours. Un 4e chien de la même portée, n° 123, servant de *témoin*, meurt infecté 4 jours après l'inoculation virulente.

Le n° 122 a des parasites 4 jours après l'inoculation; il meurt le 7e jour.

Le n° 119 montre des globules parasités le 6e jour; il meurt le 8e jour.

Le n° 120 ne succombe que le 9e jour, il avait des parasites depuis 48 heures.

De ces expériences, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° Le sérum des chiens guéris possède une action nettement préventive, mais cette action est faible; pour la mettre en évidence, il faut injecter de fortes doses de sérum; 10 c. c. ne suffisent pas pour empêcher la mort; on observe seulement un notable retard dans l'évolution de la maladie (chien n° 94). Un seul des animaux mis en expérience a résisté après l'injection du sérum d'un chien guéri (n° 87), mais il avait reçu 13 1/2 c. c. de sérum, dose énorme pour un petit chien âgé de 15 jours ;

2° Si l'on renforce l'immunité des chiens guéris par des injections répétées de sang virulent, on obtient des sérums dont l'action préventive s'exerce à des doses beaucoup moins élevées : Tous les chiens de la 2e série ont résisté, après avoir reçu 5 c. c. et même 3 c. c. de sérum, à l'inoculation virulente qu a tué le témoin en 6 jours.

Encore ne faut-il pas injecter une trop forte dose de virus. Dans notre 3e série, tous les sujets avaient reçu 3 c. c. du même sérum. Ils ont tous les trois succombé — avec un grand retard — à l'inoculation d'épreuve; mais on avait inoculé 10 gouttes d'un virus qui tue à la dose de 1 goutte les chiens témoins de même âge ;

3° Le sérum conserve son action préventive, quand il a été chauffé pendant une demi-heure à 56°-57°.

*
* *

On peut donc immuniser contre l'inoculation virulente, toujours mortelle pour les témoins. Mais l'immunité conférée par le sérum est peu durable.

Les 4 chiens de notre 2e série avaient résisté à l'inoculation du virus pratiquée 24 heures après l'injection du sérum; ils ont été réinoculés 11 jours, 19 jours et 35 jours après; tous ont eu des hématozoaires en petit nombre; 2 ont conservé toutes les apparences de la santé; les 2 autres ont été très malades. L'un a guéri pourtant; l'autre est mort et, chose curieuse c'est celui qui avait reçu la plus forte dose de sérum et qui avait été réinoculé le plus tôt (11e jour). Il est vrai que cette seconde

inoculation a été très sévère; on a injecté 10 gouttes d'un virus mortel pour les chiens neufs de cet âge à la dose de 1 goutte.

*
* *

Nous avons montré plus haut que le sérum d'un mouton traité par des injections répétées de sang de chien très riche en parasites avait une action nettement bactéricide.

L'expérience ci-après montre que ce sérum n'a qu'une faible action préventive, accusée par un simple retard dans l'évolution de la maladie.

Chien n° 137, âgé de 15 jours; reçoit sous la peau 20 c. c. de sérum de mouton (qui a reçu 290 c. c. de sang très riche en parasites); ce sérum a été chauffé à 57° pendant 30 minutes, pour lui faire perdre son pouvoir hémolytique.

Après 24 heures, on lui inocule sous la peau, en même temps qu'au *témoin* n° 132 du même âge, 10 gouttes de sang virulent.

Le témoin a des parasites dès le 4e jour; il meurt le 5e jour après l'inoculation.

Le n° 137 ne montre de parasites que le 7e jour; il succombe le 9e jour.

*
* *

L'action préventive d'un sérum donné s'exerce à dose beaucoup plus faible quand on mélange le sérum au sang virulent, avant de pratiquer l'injection. Le sérum doit être chauffé au préalable à 57°, de façon à le destituer de son action microbicide.

Expérience. — *Chien* 143, âgé de 5 jours; reçoit sous la peau un mélange de 50 gouttes de sérum renforcé du chien n° 8 (chauffé à 57° pendant 1/2 heure) et de 20 gouttes de sang parasité. Examiné pendant 10 jours, le sang de ce chien n'a jamais montré de parasites.

Le *témoin, chien* 141, de la même portée, meurt 5 jours après avoir reçu sous la peau 10 gouttes du même sang.

On obtient des résultats identiques lorsque, après l'action du sérum sur les globules parasités, on les isole par des turbinages répétés après lavages à l'eau physiologique.

Expérience. — *Chien* 130 âgé de 15 jours; reçoit sous la peau le dépôt obtenu après 3 turbinages et 2 lavages d'un mélange de 50 gouttes de sérum renforcé du chien n° 8 préalablement chauffé et de 20 gouttes de sang parasité.

Examiné pendant 17 jours, son sang n'a jamais montré de parasites.

Il semble donc qu'au contact du sérum des chiens hyperim-

munisés, les globules parasités fixent d'une façon énergique la substance sensibilisatrice du sérum qui les livre sans défense à l'action des phagocytes.

ACTION CURATIVE DU SÉRUM DES CHIENS HYPERIMMUNISÉS[1]

Le sérum des chiens dont l'immunité a été renforcée par des injections répétées de sang virulent n'est pas seulement capable d'exercer son action préventive, quand on l'injecte avant de pratiquer l'inoculation virulente. Il peut encore empêcher la mort quand on l'injecte à forte dose 24 heures et même 42 heures après l'inoculation virulente qui tue les témoins en 5 jours. Il est impuissant à retarder la mort quand on ne l'injecte qu'après l'apparition des parasites.

EXPÉRIENCE. — *Chien n°* 131, âgé de 10 jours; reçoit sous la peau, le 14 février, 8 gouttes de sang virulent; le 16 février, 42 heures après, on lui injecte sous la peau 20 c. c. de sérum renforcé du chien n° 8 (qui a reçu, après guérison, 72 c. c. de sang virulent).

Le 19 février, l'examen du sang montre de très rares globules parasités;

Le 20 et les jours suivants, les parasites sont un peu plus nombreux; l'état général reste bon;

Le 28, c'est à peine si l'on observe quelques parasites;

Le 2 mars, impossible de voir un seul globule parasité. L'animal est très gai; il a presque doublé de poids.

Chien n° 132, 10 jours; *témoin* et frère du précédent; inoculé le 14 février par 8 gouttes de sang virulent.

Le 4e jour (18 février), son sang renferme des parasites; on lui injecte sous la peau 20 c. c. de sérum du chien n° 8.

Il meurt le 19, avec un nombre considérable de parasites dans le sang du cœur et des viscères.

ESSAIS D'IMMUNISATION PAR INJECTION DE SANG VIEILLI OU CHAUFFÉ

1° *Sang vieilli.* — Nous avons dit plus haut que du sang virulent, recueilli purement et conservé à la cave à l'abri de la lumière, reste virulent pendant un temps variable, de 14 à 25 jours suivant la saison.

Ce sang, devenu incapable de donner la maladie aux animaux, ne pourrait-il pas, injecté à haute dose, leur conférer l'immunité? Les deux expériences ci-après ne sont pas favorables à cette hypothèse.

Chien nº 28; reçoit sous la peau 15 c. c. de sang conservé à la cave depuis 14 jours. Le sang inoculé était très virulent à l'état frais : inoculé sous la peau du chien nº 21, à la dose de 2 c. c. il l'avait tué en 5 jours.

Examiné avec soin pendant 10 jours, le chien nº 28 n'a jamais présenté le moindre malaise; sa température est restée normale; son sang n'a jamais eu de parasites.

Réinoculé sous la peau avec 3 c. c. de sang virulent, il a été très malade, il a eu de nombreux hématozooaires; pourtant il a survécu.

Chien nº 29; reçoit dans la jugulaire 15 c. c. du même sang, vieux de 19 jours; examiné pendant 12 jours il ne présente rien d'anormal; pas de fièvre; pas de parasites.

L'inoculation d'épreuve le tue en 6 jours;

2º *Sang chauffé.* — Nous avons dit plus haut que le parasite est tué par une température relativement peu élevée, 45º.

Peut-être réussirait-on, par un chauffage mesuré, à atténuer sa virulence et à le transformer en vaccin? Cet espoir ne s'est pas réalisé. Les expériences ci-après montrent que l'atténuation du virus par le chauffage est sinon impossible, du moins très difficile à réaliser.

Toutes ces expériences ont porté sur de tout jeunes chiens âgés de trois semaines environ.

Chien nº 22; reçoit sous la peau 5 c. c. de sang virulent chauffé à 50º pendant 30 minutes. Examiné pendant 18 jours, il ne montre ni fièvre ni parasites.

L'inoculation d'épreuve le tue en 56 heures.

Chien nº 25; reçoit sous la peau 10 c. c. de sang chauffé à 50º pendant 1 heure et demie. — Pendant 18 jours ne montre rien d'anormal.

Succombe en 4 jours à l'inoculation d'épreuve.

Témoin nº 23; reçoit sous la peau 3 c. c. du même sang non chauffé prend la maladie et meurt en 5 jours.

Nos 44 et 45; inoculés sous la peau avec 3 c. c. de sang virulent, chauffés à 48º pendant une demi-heure.

Nos 46 et 47; inoculés sous la peau avec 3 c. c. du même sang chauffé à 45º pendant une demi-heure.

Ces 4 chiens restent bien portants.

Le témoin nº 48, inoculé avec le même sang non chauffé, meurt en 6 jours.

A l'inoculation d'épreuve, pratiquée 10 et 23 jours après, les 4 chiens ci-dessus prennent la maladie et meurent du 5e au 7e jour.

Nos 56 et 57, inoculés sous la peau par 2 c. c. de sang virulent chauffé pendant une demi-heure à 43º, meurent les 5e et 8e jour.

Le témoin nº 58, inoculé sous la peau avec le même sang, non chauffé, est mort le 7e jour.

N° 71, reçoit sous la peau 2 1/2 c. c. de sang chauffé 1 heure à 43°; meurt le 6e jour.

N° 72, même sang chauffé une demi-heure à 44°, meurt le 5e jour.

N° 74, même sang chauffé à 44° pendant 50 minutes; meurt le 7e jour.

N° 75, même sang chauffé à 44° pendant une heure; meurt le 9e jour.

Témoins nos 70 et 76; 1 c. c. du même sang non chauffé, meurent les 5e et 6e jours.

N° 81, 2 c. c. de sang virulent chauffé à 44° pendant 1 h. 30m.

N° 82, 2 c. c. du même sang chauffé à 44° pendant 1 h. 15m.

Ces 2 chiens, examinés pendant 15 jours, n'ont jamais présenté de parasites.

Le *témoin* n° 83, qui n'avait reçu que 1 c. c. du même sang non chauffé était mort le 6e jour.

Réinoculé sous la peau 15 jours, après avec 1 c. c. de sang virulent non chauffé, le n° 82 meurt le 6e jour.

En résumé, le sang virulent chauffé à 45° et au-dessus perd toute virulence.

Au dessous de 44° le chauffage prolongé pendant plus de 1 heure ne paraît exercer aucune action sur la vitalité et sur la virulence du parasite.

Chauffé à 44° pendant 30 minutes, 50 minutes, et 1 heure, le sang reste virulent et tue encore les petits chiens inoculés; mais la mort survient d'autant plus tard que la durée du chauffage a été plus longue.

Le chauffage à 44° pendant 1 heure 1/2, et même pendant 1 h. 15, détruit la virulence.

Aucun des chiens qui ont résisté à l'inoculation du sang chauffé n'a résisté à l'inoculation d'épreuve. Aux doses injectées, le sang chauffé ne paraît donc pas capable de conférer l'immunité.

APPENDICE

OBSERVATIONS TYPES DE LA MALADIE EXPÉRIMENTALE

1° TYPE AIGU. — Chien n° 4. — Adulte, de petite taille, gai et vigoureux.

Température avant l'inoculation, 38°,3.

Nombre des globules rouges : 5,240,000.

Le 6 avril 1901, ce chien reçoit dans la jugulaire 2 c. c. de sang parasité.

7 avril. — État général excellent.

Pas de parasites visibles dans le sang de l'oreille. 5,560,000 globules rouges.

8 avril. — Appétit et gaité conservés. Température supérieure à 40°.

5,960,000 globules rouges. L'examen du sang montre de très rares parasite quelques-uns pyriformes; urine normale.

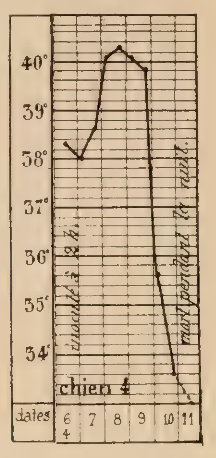


Fig. 5 Injection intraveineuse.

9 avril. — Tristesse, inappétence; 124 pulsations; urine normale; 5,240,000 globules rouges. Très nombreux hématozaires, volumineux, — amœboides; beaucoup de globules en renfermant 4, 6 et plus.

10 avril (matin). — État général misérable; parésie du train postérieur; sensibilité générale émoussée; la peau a perdu sa souplesse; extrémités froides; ictère très accusé. Urine rouge foncé, hémoglobinique; 120 pulsations irrégulières; 2,600,000 globules rouges. — Hypothermie : 35°,6; nombreux parasites, la plupart ronds et petits, quelques-uns piriformes ou amœboïdes.

Le soir, même état encore plus grave; température, 33°,5; 2,200,000 globules rouges.

11 avril. — Le chien est trouvé mort.

Autopsie. — Ictère intense; les muqueuses, la sclérotique, la peau, la graisse et tous les organes ont une coloration jaune de chrome.

Rate hypertrophiée, un peu molle, de couleur noirâtre, devenant rutilante au contact de l'air.

Reins congestionnés et infiltrés; de la coupe exsude un liquide trouble jaune rougeâtre.

Foie de volume normal, de couleur pâle un peu jaunâtre; vésicule biliaire pleine de bile foncée, très sirupeuse.

Vessie pleine d'urine épaisse, de couleur jus de pruneau.

Léger épanchement rosé dans le péricarde.

Cœur pâle; nombreuses et fines pétéchies sur l'épicarde et l'endocarde gauches.

Moelle osseuse congestionnée, de couleur jaune rougeâtre.

Le sang du cœur et celui des différents viscères sont très riches en hématozoaires, la plupart arrondis et peu volumineux;

2° TYPE CHRONIQUE. — *Chien n° 61*, adulte de taille moyenne; état général excellent. 5,840,000 globules rouges; Température 38°7. (Voir la courbe 6.)

12 octobre 1901. — Ce chien reçoit dans la jugulaire 6 c. c. de sang prélevé sur un chien atteint de la maladie naturelle (Obs. III de M. Almy).

13 octobre. — État général satisfaisant; à l'examen du sang, on observe de très rares parasites.

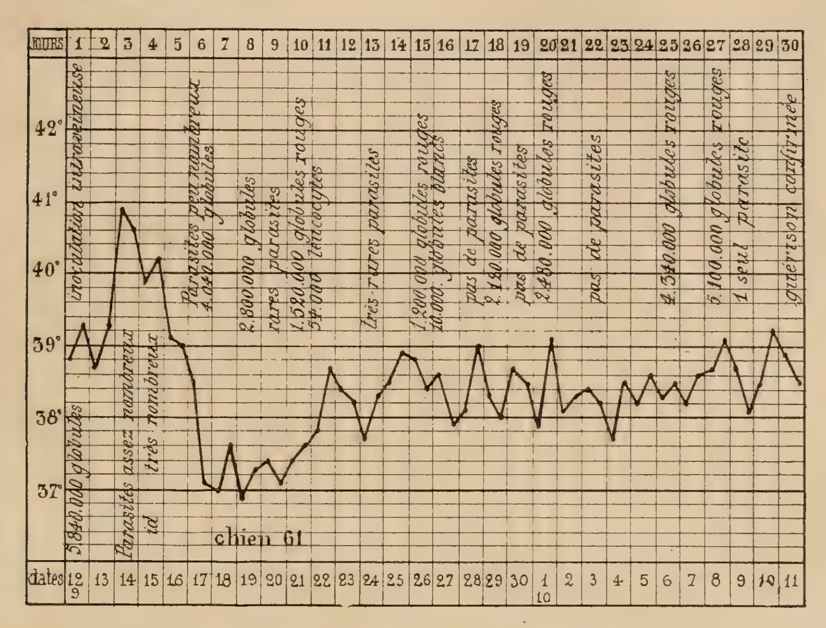


Fig. 6. Forme chronique, Injection intraveineuse.

14 octobre. — Le chien est moins gai et mange moins bien que d'ordinaire; hématozoaires moins rares que la veille.

15 octobre. — État général moins bon; tristesse, abattement, inappétence presque absolue. Très nombreux parasites de toutes formes : ronds, pyriformes, amœboïdes.

17 octobre. — Les parasites sont moins nombreux, mais l'état général est mauvais; le chien est triste; il reste couché et ne touche pas à sa soupe; muqueuses pâles un peu bleuâtres. 4,040,000 globules rouges.

19 octobre. — Hématozoaires très peu nombreux; anémie plus accusée; muqueuses très pâles; insensibilité générale; anorexie; 2,820,000 globules rouges.

21 octobre. — Même état général; très rares parasites; sang très pâle; 1,520,000 globules rouges; 54,000 globules blancs; beaucoup de mononucléaires et d'hématies nucléées.

26 octobre. — État général toujours mauvais; appétit presque nul; prostration; insensibilité générale; 1,200,000 globules rouges, 10,000 globules blancs. On ne réussit pas à voir d'hématozaires.

29 octobre. — Légère amélioration de l'état général; l'appétit revient; la tristesse et la faiblesse diminuent; pas de parasites visibles; 2,120,000 globules rouges.

1er novembre. — L'amélioration s'accentue; 2,480,000 globules rouges; quelques-uns sont nucléés; pas de parasites visibles.

6 novembre. — État général bien meilleur; muqueuses rosées; l'animal est gai et mange avidement; 4,380,000 globules rouges; pas de parasites.

8 novembre. — 5,100,000 globules rouges; hématoblastes très nombreux; on observe un seul globule parasité.

A compter de ce moment, l'animal est considéré comme définitivement guéri.

EXPLICATION DES PLANCHES V ET VI

Pl. III. — Fig. I. Sang de la circulation générale. Chien 99. (Thionine phéniquée.) Obj. 1/12. Oculaire I (Stiassine).

Fig. II. Sang du foie. Chien 99.

Fig. III. Frottis de rein. Chien 61.

Fig. IV. Sang conservé à la cave. Chien 6, *a*, 10 jours; *b*, 2 mois.

Fig. V. Formes amœboïdes du parasite. Chien 99.

Fig. VI. Parasite en voie de division. Phases successives. Chien 99. (Sang de l'oreille.)

Fig. VII. Parasite en voie de division. Chien 99. (Sang du foie).

Pl. IV. — Fig. VIII. Phagocytose de globules infectés. 1, 2, 3, 4. Macrophages de la rate; chien 18; 5. Un macrophage du sang de l'oreille; chien 41.

Fig. IX. Coupe de moelle épinière (région lombaire); chien 14.

Fig. X. Coupe de rein, chien 61.

SECONDE NOTE SUR LA MALARIA DES BOVIDÉS
(PIROPLASMOSE BOVINE)

Par MM. M. NICOLLE ET ADIL-BEY.

Cette note servira de complément à celle que nous avons publiée en 1899. Elle date de la même époque. Nous ne l'avons pas fait paraître à ce moment, parce que nous espérions continuer nos recherches sur le sujet, ce qui ne nous a pas été possible.

Nous indiquons sommairement ici les principales lésions, rencontrées par nous dans la piroplasmose, ainsi que les procédés employés pour la recherche des hématozoaires dans le sang et les viscères.

***

Les lésions ont été étudiées dans le foie, le rein et la rate, après fixation de ces organes au Flemming et coloration par la méthode Kernschwarz-Safranine.

Foie. — Il faut distinguer entre les foies d'un rouge brun uniforme et les foies granuleux, d'un jaune doré.

Foies uniformes. — Les vaisseaux sont dilatés. Cette congestion porte principalement sur la région sus-hépatique, de même que les lésions suivantes : pigmentation des cellules hépatiques, des leucocytes et des éléments de Kuppfer; dégénérescence vacuolaire des cellules hépatiques.

Foies granuleux. — On rencontre des altérations, extrêmement marquées, des régions sus-hépatiques, et de ce que M. Sabourin nomme les « zones sus-hépatiques ». Elles consistent dans une congestion très intense; dans la pigmentation des cellules hépatiques, accompagnée d'une vacuolisation qui va jusqu'à la nécrose; et dans une forte leucocytose. Ces lésions, siègeant au centre du lobule et le long des anastomoses centro-lobulaires, forment les bandes gris-rosé qui, lors de l'examen à l'œil nu, circonscrivent, dans le « lobule investi », les îlots de parenchyme doré à axe portal. La teinte dorée est due, bien entendu, à l'intensité de la pigmentation anormale.

Rein. — On note de la congestion, surtout au niveau du bouquet glomérulaire. L'épithelium des tubes contournés apparaît granuleux, vacuolaire et pigmenté (la pigmentation se montre surtout abondante dans les cas à foie doré). La lumière des tubuli contient des exsudats albumineux, grenus ou non. Les tubes droits sont presque sains.

Rate. — L'organe est congestionné. On rencontre de nombreux amas pigmentaires dans les grandes cellules mononucléaires de la pulpe splénique.

⁂

Recherche des hématozoaires dans le sang. — On puise le sang dans la veine jugulaire, à l'aide d'une pipette effilée, ce qui n'offre aucune difficulté quand on en a tant soit peu l'habitude, On dépose un mince filet de sang, au voisinage d'une des extrémités d'un porte-objet (propre et soigneusement flambé), perpendiculairement au grand axe de celui-ci. Puis on étale le plus rapidement possible, avec le bord d'une *lame de carton flexible* (fragment de carte de visite, par exemple). On favorise la dessiccation de la couche sanguine en agitant vivement la lame. Nous ne saurions trop recommander ce procédé d'étalement du sang, que nous employons depuis longtemps et qui donne des préparations absolument parfaites.

Nous fixons, d'abord, pendant quelques minutes. sur une plaque chauffée vers 110° (c'est-à-dire, comme l'a montré M. Ehrlich, immédiatement au-dessous de la température où se produit l'état sphéroïdal) ; puis, pendant une minute, dans une solution aqueuse de sublimé à 3 0/0. Si la préparation date de plus de 2 jours, il est inutile d'avoir recours à la chaleur, car l'insolubilisation des albuminoïdes s'est alors produite par la seule dessication. Par contre, lorsque la préparation date de quelques semaines, la dessication prolongée devient souvient nuisible. Aussi vaut-il mieux, en thèse générale, fixer les lames au fur et à mesure (au moins par la chaleur), quitte à ne les colorer que par la suite.

La coloration s'obtient en faisant agir, pendant deux minutes, la solution suivante :

Bleu polychromatique de Unna................	1 volume.
Eau phéniquée à 5 0/0........................	1 —
Eau distillée...............................	3 volumes.

Les parasites et les noyaux des leucocytes prennent un ton violet foncé; l'hémoglobine des hématies, une couleur vert pomme, et les granulations basophiles, une teinte rouge rubis. Les granulations éosinophiles demeurent incolores. Il est bon de de pas trop prolonger la coloration au delà du temps indiqué. On lave, sèche et examine directement, en déposant une goutte d'huile de cèdre sur la préparation.

La méthode précédente ne saurait être mise en parallèle avec celle que M. Laveran a fait connaître depuis, mais elle peut rendre des services dans la simple *recherche* des divers hématozoaires. De plus, en fournissant, sans aucune difficulté, des définitions très nettes, elle constitue un excellent procédé de coloration polychromatique directe, auquel nous avons recours, à chaque instant, pour les préparations sur lames.

Les préparations de la pulpe des viscères se pratiquent comme celles du sang. Nous n'aborderons pas ici l'histoire morphologique, aujourd'hui bien connue, du *piroplasma bigeminum*. Nous ferons seulement remarquer que, durant la maladie qu'il occasionne, on observe un peu partout, mais principalement dans le foie et la rate, les apparences caractéristiques d'une active phagocytose. Ce sont les grands mononucléaires qui détruisent les hématies parasitées, ainsi que nous l'avons souvent constaté. Signalons enfin, dans le sang, la fréquence des hématies géantes; les hématies nucléées sont plus rares.

Recherche des hématozoaires dans les coupes. — Les viscères ont été fixés au moyen du sublimé aqueux saturé. Le procédé de coloration qui nous a le mieux réussi est le suivant. On teinte les coupes par le bleu de méthylène phéniqué (solution de bleu à 1 0/0 dans l'eau phéniquée à 1 0/0), pendant une demi-minute; on passe, durant une quinzaine de secondes, dans le chromate jaune de potasse (solution aqueuse à 1 0/0); puis on monte au baume, après lavage, déshydratations et éclaircissement. Nous nous proposons de revenir sur cette méthode, excellente dans bien des circonstances.

SUR LA MARCHE DE LA COURBE D'ANTITOXINE

DANS

L'IMMUNISATION ACTIVE CONTRE LE BOTULISME

Par J. FORSSMAN et E. LUNDSTROM

(Laboratoire bactériologique de l'Université de Lund, Suède.)

L'année même où paraissait le travail fondamental de van Ermengen (1) sur le *Bac. botulinus*, W. Kempner (2) exposait ses recherches sur l'antitoxine du botulisme, où il montre qu'il n'a pas réussi à amener, chez les cobayes ni chez les lapins, une immunité active contre la toxine botulique, tandis qu'il a pu, sans difficultés sérieuses, et rien que par des injections de toxine à doses croissantes, donner aux chèvres une forte immunité, et en tirer ainsi un puissant sérum antibotulique.

Forssman (3), — qui a fait ensuite une étude spéciale de la toxine et de l'antitoxine du botulisme, — a réussi, en pratiquant l'immunisation au moyen de toxine très atténuée par la chaleur, à immuniser activement les cobayes et les lapins; et, en déterminant la teneur en antitoxine d'un sérum provenant d'un cobaye ainsi immunisé, il a constaté que cette teneur était de 1,000, d'après le système d'évaluation appliqué par Kempner au sérum antibotulique [1]. Mais l'immunisation de ces animaux présentait de graves difficultés (la plupart mouraient), et comme ces difficultés n'étaient pas en rapport avec les petites quantités de sérum qu'on pouvait en retirer, Forssman a préféré l'immunisation facile et sûre d'une chèvre.

En comparant d'une part les tableaux d'immunisation de chèvres que Kempner a communiqués dans son étude, et d'autre part le tableau que Forssman a obtenu en immunisant sa chèvre, on remarque une différence très importante en ce qui concerne *le rapport* entre les quantités de toxine injectées et la valeur antitoxique des sérums produits.

1. Kempner désigne sous le nom de *sérum antibotulique normal* un sérum dont 1 c. c. injecté à un cobaye de 300 grammes en mélange avec 1 « testdose » (la testdose étant la dose de toxine capable de tuer en 48 heures un cobaye du poids de 300 grammes) préserve l'animal de la mort (mais sans neutralisation complète de la toxine). Ce système d'évaluation ne tient pas compte de la présence de toxines ni de toxoïdes dans le poison du botulisme ; du reste, le « spectre » de la toxine du botulisme n'a pas encore été étudié. La valeur du sérum ne correspond donc pas en ce cas à la valeur qui a été introduite par Ehrlich pour le sérum de la diphtérie.

Ce désaccord apparaît clairement dans le tableau suivant, où, pour faciliter la comparaison, les différentes solutions de toxine injectées ont été ramenées par le calcul à une toxine de 0,0001 comme testdose.

	QUANTITÉ de toxine injectée.	ESPACE de temps occupé par l'injection de cette quantité.	DATE de saignée par rapport à l'injection de toxine immédiatement précédente.	VALEUR de sérum.
Kempner. Chèvre II..	Env. 399 c. c.	Env. 4 mois.	11 jours.	1.000
— —	— 1.099 —	— 6 m. 1/2.	9 —	100.000
— Chèvre III.	— 163 —	— 2 mois.	9 —	100
— —	— 763 —	— 4 —	14 —	10.000
Forssman. Chèvre...	— $12^{cc},5$	— 4 m. 1/2.	20 —	25.000
— —	— 152 c. c.	— 7 mois.	16 —	100.000

Comme on peut le voir, Forssman a obtenu, après injection de quantités de toxine relativement insignifiantes, des sérums équivalents et même supérieurs à ceux obtenus par Kempner après injection de quantités considérables de toxine. Or, la seule différence entre les procédés employés par les deux auteurs, c'est que Forssman a pratiqué l'immunisation avec une lenteur sensiblement plus grande, c'est-à-dire qu'il a fait les injections à des intervalles plus longs que Kempner, et qu'enfin les saignées ont été faites par lui plus tard par rapport à la dernière injection de toxine. Comme Forssman se refusait à mettre une différence aussi forte dans la proportion d'antitoxine sur le compte des variations individuelles, et comme d'ailleurs il n'était guère disposé à admettre que les solutions toxiques, employées dans les injections, aient pu avoir une influence antitoxigène aussi variable, il a supposé, — bien que sous toutes réserves, — que la différence en question devait tenir à la différence signalée plus haut entre les procédés des deux auteurs.

Comment ce facteur a-t-il pu exercer une telle influence sur la production des antitoxines? C'est ce que Forssman a essayé de s'expliquer par une hypothèse relative à la marche de la courbe d'antitoxine. En effet, dans le cas où la courbe se développerait

de façon à atteindre tardivement son apogée, comme c'est le cas par exemple pour le tétanos, d'après Ehrlich-Brieger(4), Forssman serait arrivé avec ses injections de toxine plus près du point culminant de la courbe que Kempner, — circonstance qui est peut-être de nature à favoriser, du moins dans une certaine mesure, la production de l'antitoxine, — et surtout Forssman aurait en ce cas fait des saignées plus près de ce point culminant, et ainsi, en admettant la réalité de cette hypothèse, il aurait dû nécessairement faire une récolte beaucoup plus riche que si la saignée avait eu lieu quelques jours plus tôt.

Dans le cas où cette hypothèse relative à la marche de la courbe d'antitoxine correspondrait à la réalité, il serait important de pouvoir la remplacer par un fait; mais, dans le cas où les recherches démontreraient que la courbe d'antitoxine botulique a une forme se rapprochant par exemple de celle de la diphtérie, les essais d'immunisation faits par Forssman et Kempner pourraient servir à prouver une fois de plus qu'il est impossible, avec notre connaissance actuelle des facteurs qui déterminent la formation des antitoxines, de prévoir même approximativement la marche et l'intensité de ce phénomène. Dans tous les cas, un examen de cette courbe présentait de l'intérêt, d'autant plus que jusqu'ici, on n'a tracé de courbes d'antitoxine que pour le tétanos (4) et la diphtérie (5).

Pour ces raisons, nous avons entrepris d'étudier la marche de la courbe d'antitoxine chez une chèvre qui a été immunisée contre la toxine du botulisme, et c'est le résultat de cette étude que nous communiquons ci-dessous.

Nous avions pensé, au début, à tracer notre courbe en évaluant le sérum de façon à donner, par centimètre cube de sérum, le nombre de « testdoses » *complètement neutralisées* chez un cobaye d'un certain poids, et les chiffres ainsi obtenus auraient correspondu à la valeur L_0 de Ehrlich. Mais l'expérience nous a montré que cette évaluation présentait de très grandes difficultés. En effet, dans l'état actuel de nos observations, le premier signe par lequel se manifeste l'action de la toxine sur le cobaye, c'est un relâchement dans la musculature de l'abdomen, et ce symptôme dénonce les plus faibles quantités de toxine.

Il s'agissait donc de marquer la limite entre les mélanges de sérum et de toxine, après lesquels se produisait un relâchement

léger et ceux après lesquels les muscles abdominaux conservaient leur tonicité. Mais c'était là une entreprise à peu près impossible; car l'élasticité de la musculature abdominale varie très sensiblement chez les cobayes normaux, et c'est pourquoi il était souvent impossible, dans le cas où on plaçait ensemble des animaux non injectés et des animaux injectés, de distinguer les deux catégories sur le seul examen de la musculature abdominale. Nous n'avons pas réussi non plus à fixer un degré déterminé de relâchement pouvant servir de base à notre estimation, car toutes les nuances imaginables se présentaient à nous entre le relâchement extrême et la tonicité complète. Nous nous sommes donc décidés à déterminer, d'après un autre principe, la contenance en antitoxine du sérum injecté, savoir en mélangeant le sérum et la toxine dans des proportions telles que les animaux injectés par ce mélange mouraient en 48 heures, autrement dit si une « testdose » se trouvait libre dans le mélange; les quantités calculées par centimètre cube de sérum correspondent ainsi à la valeur L_1 de Ehrlich, sauf la restriction que nous allons faire.

La valeur L_1 peut être utilisée aussi bien que L_0 pour le tracé de la courbe, mais à la condition que la même unité serve de base à toutes les déterminations, c'est-à-dire qu'une toxine provenant d'une seule culture soit employée pour toutes les déterminations, et que cette toxine ne subisse pas de modification et reste constante depuis la première détermination jusqu'à la dernière. De la sorte, toutes les quantités se trouvent comparables, étant calculées d'après la même mesure; tandis que, les valeurs de sérum, déterminées avec des toxines provenant de cultures botuliques différentes, même si les testdoses sont les mêmes, ne peuvent guère se comparer entre elles, attendu que les conditions de saturation d'antitoxine pour les toxines avec testdoses égales peuvent varier considérablement. Nous avons pu observer plus d'une preuve de ce fait au cours de nos recherches. C'est en observant les conditions ci-dessus mentionnées, que nos déterminations ont été faites. Ainsi nous avons toujours employé une seule et même toxine dont la testdose s'est maintenue à 0 c. c. 002 pendant toute la durée des essais. Cependant une exception a été faite pour les deux premiers sérums (I et 1) de la première courbe, et c'est pourquoi nous avons signalé cette particularité par une ligne ponctuée. Ces sérums sont en effet

déterminés par une autre toxine, et par suite ils sont comparables entre eux, mais non avec les autres valeurs marquées sur la courbe[1].

Tous les cobayes, employés pour la *détermination définitive*, étaient nés et avaient été nourris ensemble. Le poids a varié entre 250 et 285 grammes; lors de la détermination des sérums immédiatement voisins, nous avons veillé à ce qu'il n'y eût pas entre les animaux une différence de poids supérieure à 10 grammes. Mais pour les nombreuses déterminations servant à nous orienter, nous avons employé des sujets de poids plus variables.

Pour ce qui est des quantités qui devaient être injectées, nous nous sommes laissés guider par le raisonnement suivant. Si je mélange sérum et toxine et que j'injecte à un cobaye de 300 grammes une quantité de ce mélange contenant d'après mes calculs 10 testdoses, si je constate ensuite que 1 testdose était libre dans le mélange, attendu que le sujet est mort en 48 heures, le rapport des testdoses neutralisées aux testdoses libres est comme 9 : 1. Si le mélange était tel que précisément 1 c. c. de sérum correspondait à 10 testdoses de toxine, la valeur L_1 est déterminée pour ce sérum avec toute la précision possible. Mais si 0,1 ou 0,01 c. c. de sérum correspondaient à 10 testdoses, c'est-à-dire si en d'autres termes le sérum était 10 ou 100 fois plus fort, je sais, par l'effet de l'injection sur les animaux d'épreuve, que sur 0,1 c. c. et 0,01 c. c., 9 testdoses sont neutralisées et 1 reste libre; mais quand je calcule la valeur du sérum pour 1 c. c. j'obtiens, par centimètre cube de sérum, les rapports 90 : 10 ou 900 : 100 entre les testdoses neutralisées et celles qui sont libres; et quand j'arrive à des sérums d'une valeur très élevée, par exemple 20,000 fois plus forts, le rapport devient : 180,000 : 20,000. Mais, on s'est ainsi trop éloigné de la valeur L_1, et, — ce qui est plus grave, — on s'aperçoit que de petites erreurs dans la détermination proprement dite, — par exemple une légère variation dans la résistance de

1. Ces deux indications de sérum proviennent de l'époque où nous essayions de déterminer la valeur L_0. Plus tard, lorsque nous nous sommes décidés, après de nombreux essais, à prendre pour base de notre courbe la valeur L_1, nos provisions de ces deux sérums étaient épuisées, et c'est pourquoi il a été impossible de faire des déterminations nouvelles avec la toxine employée ensuite pour les autres sérums. Cependant, nous avons, pour les deux sérums en question, déterminé L_1 en même temps que L_0 et avec la même toxine. Le rapport entre L_1 et L_0 s'est trouvé être, pour cette toxine, d'environ 2 : 1; la proportion était toute différente pour la toxine employée plus tard.

l'animal à la toxine, — atteignent de grandes proportions lorsqu'il s'agit de calculer la valeur d'un sérum puissant. Un excédent libre de 1,1 testdose au lieu de 1 testdose avance la mort de quelques heures; mais, même après une dose simple, le temps de la mort varie de quelques heures sur une série d'animaux d'ailleurs identiques, autant que nous pouvons en juger. Il se produit ainsi des erreurs qu'il est impossible d'éviter. Si l'on calcule l'influence qu'une erreur, comme celle que nous venons de prendre pour exemple, peut exercer sur l'évaluation d'un sérum d'une valeur de 100,000, on voit qu'elle atteint 1,000 unités. En élevant d'une manière sensible la proportion des quantités injectées, on s'approche sensiblement de L_1 et on diminue en même temps l'importance de l'erreur d'épreuve, comme le démontre un simple calcul. Pour déterminer L_1 avec une exactitude complète, pour des sérums forts, par exemple pour un sérum où $L_1 = 250,000$, on serait forcé d'injecter cette forte quantité de toxine plus le sérum correspondant, ce qui, même en employant une toxine avec 0,0001 c. c. comme testdose, constituerait une masse de liquide trop forte pour être injectée à la fois à un cobaye de 300 grammes. C'est pourquoi, il faut prendre un moyen terme, et choisir une dose qui puisse être injectée facilement, mais en même temps aussi qui contienne assez de testdoses pour qu'on ne s'éloigne pas trop de la valeur L_1. Pour les déterminations relatives aux sérums de valeur inférieure à 100,000, nous avons donc injecté des doses, qui, d'après nos calculs, contenaient 200 testdoses, et pour des sérums de valeur supérieure nous avons fait des injections contenant 500 testdoses.

Si l'on calcule le rapport entre les testdoses neutralisées et les testdoses libres, dans un sérum évalué à 100.000, par injection de 200 testdoses, on trouve que le susdit rapport est de 99500 : 500, et c'est la même chose pour un sérum évalué à 250.000 par injection de 500 testdoses. La différence entre ces valeurs et les valeurs réelles L_1 occuperait sur la courbe la quatrième partie d'un carré, et par suite elle ne peut être considérée comme ayant une influence sur l'aspect général de la courbe; du reste la différence devient moindre pour les valeurs inférieures, dans la même mesure que s'abaisse la valeur du sérum. Une erreur d'épreuve, comme celle que nous venons de prendre pour exemple, aurait encore

une importance moins grande lors de l'injection des doses en question. Sur des sérums évalués 100,000 et 250,000, une faute de ce genre n'agit que pour 50 unités, correspondant à 1/40 de carré sur la courbe ci-jointe, et est par suite sans influence sur le dessin de cette courbe.

Après que les déterminations d'orientation, plus ou moins

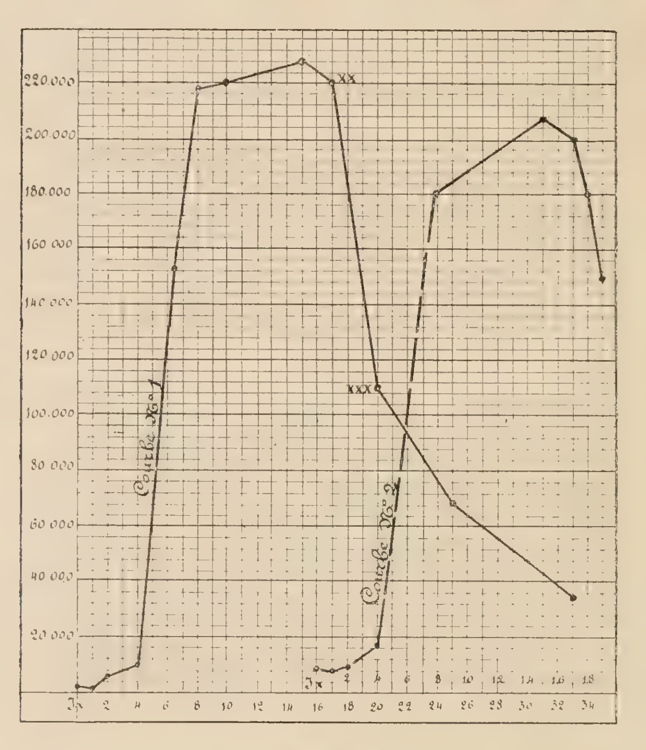


Fig. 1.

exactes, nous eurent permis de nous faire une idée approximative de la marche de la courbe, nous avons déterminé soigneusement, de la façon que nous venons de dire, les sérums qui, sur la courbe, sont spécialement indiqués par des points. Une observation à faire, c'est que par suite des accidents nous avons jugé superflu de faire des déterminations aussi rigoureuses pour les sérums intermédiaires; cependant, après avoir trouvé la valeur des sérums spécialement marqués sur la courbe, nous nous sommes assurés que, par exemple, les sérums voisins de 15 étaient de valeur

inférieure à 15, que le sérum 18 sur la première courbe se trouvait sensiblement inférieur au sérum 17, etc...

Comme on le voit, les deux courbes ont une marche presque complètement parallèle. Il y a entre les deux un espace de temps de trois mois. Dans cet intervalle, l'antitoxine s'est donc abaissée de 71,000 à 9,500, chiffre par lequel commence la seconde courbe. Au commencement de la première courbe, nous trouvons le chiffre 2,000. Cette contenance en antitoxine est le résidu d'une immunisation qui avait été faite longtemps auparavant. En

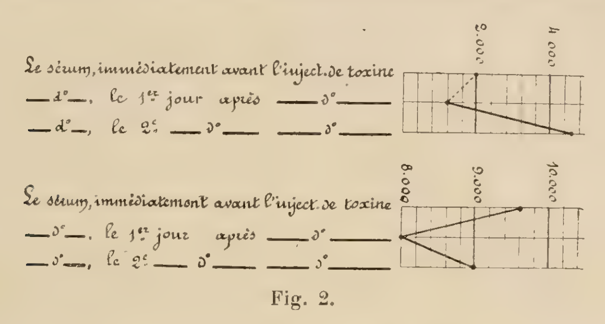


Fig. 2.

effet, 14 mois plus tôt, le même animal avait donné un sérum antibotulique représenté par 100,000 d'après l'évaluation kempnérienne, et depuis cette époque il n'avait pas reçu d'injection de toxine. Ainsi pendant ce long laps de temps l'antitoxine n'avait pas complètement disparu du sang, et avait seulement baissé de 100000 à 2000 (car, d'après ce qui précède, il est clair qu'il n'y a qu'une différence insignifiante entre la valeur donnée sur la courbe et la valeur 2,000 de Kempner).

Comme on devait s'y attendre, après les deux injections de toxines les sérums perdirent de leur valeur. Au commencement de la première courbe, le sérum pouvait avec certitude neutraliser complètement (L_0) 1000 testdoses. La chèvre pesant environ 36 kilogrammes; si l'on admet que 1/13e de ce poids provient du sang et que la moitié du sang ce qui est (vraisemblablement une estimation trop faible) est constituée par du sérum, on obtient ainsi environ 1400 c.c. de sérum. Le sérum total de la chèvre neutralise ainsi *in vitro* 1,400,000 testdoses. Dans ces conditions, on s'attend à ce qu'une injection de 100,000 testdoses n'amène pas dans la contenance en antitoxine une baisse supérieure à environ 72 unités par c. c.; mais en réalité la valeur du

sérum après cette injection diminue d'environ 5 fois 1/2, soit de 400 unités à peu près, de sorte que le lendemain de l'injection de toxine, 1 c.c. de sérum ne neutralise pas complètement (L_0) plus de 600 testdoses[1].

Nous retrouvons donc, dans l'immunisation botulique, ce phénomène qui a été observé depuis longtemps dans l'immunisation contre la diphtérie, à savoir qu'une injection de toxine produit, chez un animal préalablement immunisé, une chute d'antitoxine beaucoup plus grande qu'on ne s'y attendrait d'après la quantité employée de toxine, si on base son calcul sur la relation de saturation entre toxine et antitoxine *in vitro*.

En ce qui concerne l'aspect des courbes, on voit qu'elles présentent un faîte assez nettement dessiné, commençant au 8e jour et finissant au 17e, point à partir duquel la courbe tombe brusquement, et que la valeur la plus élevée des deux courbes se trouve au 15e jour. Les abscisses, pour les points correspondants sur les deux courbes, sont ainsi exactement les mêmes, tandis que les conditions sont loin d'être analogues pour ce qui est des ordonnées.

Ces dernières sont, pour les mêmes abscisses, sensiblement plus petites dans la seconde courbe que dans la première, et cela nous montre qu'ici aussi, comme on l'avait déjà observé dans l'immunisation diphtérique, il n'existe aucun rapport déterminé entre la dose de toxine injectée et la quantité d'antitoxine produite, puisque dans les deux cas on avait injecté la même dose de toxine, savoir 100,000 testdoses.

Les abscisses aux points les plus importants des courbes restent donc constantes, tandis que les ordonnées varient. Partant de cette hypothèse que la formation de l'antitoxine chez la chèvre procède toujours d'après notre schéma, et qu'ainsi le faîte et la valeur maximum d'antitoxine se trouvent toujours aux mêmes jours, c'est-à-dire ont les mêmes abscisses, tandis que les ordonnées (autrement dit l'intensité de la sécrétion antitoxique) sont seules à varier, nous voulons considérer de nouveau

1. Les valeurs L_0 pour les deux premiers sérums ne sont pas pointées sur les courbes. D'ailleurs le rapport en question n'apparaît guère sur les grandes courbes avec leurs chiffres élevés correspondant à de petites distances d'ordonnées. En revanche, sur les deux courbes spéciales que nous avons adjointes et qui correspondent aux premiers jours de chaque courbe, il a été possible, par une autre évaluation des ordonnées, de montrer clairement ce rapport et de donner avec plus d'exactitude la valeur des sérums qui s'y rapportent.

pour un moment les tableaux d'immunisation provenant de Kempner et de Forssman pour voir si la différence entre les résultats obtenus par eux se laisse expliquer à l'aide de la courbe ci-dessus. Nous remarquons tout de suite que les valeurs supérieures d'antitoxine, obtenues par Forssman, ne peuvent pas être dues à ce fait qu'il est arrivé, par ses saignées, plus près que Kempner du climax de la courbe; au contraire, Kempner a fait toutes ses saignées dans la période fastigiale, ce qui n'a été le cas qu'une seule fois pour Forssman. La différence entre les résultats atteints doit donc tenir à un des facteurs suivants ou à tous ensemble : 1° les intervalles de temps plus longs qui se sont écoulés entre les injections de toxine de Forssman; 2° les valeurs différentes des solutions de toxine employées en ce qui concerne la formation de l'antitoxine ; et 3° les variations individuelles relativement à l'aptitude des différents individus à produire l'antitoxine. Dans quelle mesure ces divers facteurs ont exercé leur influence, c'est ce qu'il nous est impossible de déterminer. Enfin, si nous comparons la courbe antibotulique avec les courbes déjà tracées pour le tétanos et la diphtérie, nous voyons que pour ce qui est de la position du climax, autrement dit de son abscisse, la courbe antibotulique se trouve placée entre celle de la diphtérie (avec climax le 9 à 10e jour) et celle du tétanos (avec climax le 17e jour après l'injection immédiatement précédente de toxine).

BIBLIOGRAPHIE

1. Van Ermengem. Ueber einen neuen anaeroben Bacillus and sine Beziehung zum Botulismus. *Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. krankh.* Bd. XXVI, 1897.
2. W. Kempner. Weiterer Beitrag zur Lehre von der Fleischvergiftung. Das Antitoxin des Botulismus. *Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. krankh.* Bd. XXVI, 1897.
3. Forssman. Lunds Universitets Arskritt 1900. (Compte rendu dans *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde.* Bd. XIX, 1901.)
4. Ehrlich und Brieger. Beitraege zur Kenntniss der Milch immunisirter Thiere *Zeitschr. f. Hyg.* Bd. XIII, 1893.
5. Salomonsen et Madsen. Om forskestigheder i Serums antidiphteriske Styrke hos atchiol immuniserede heste. (*Nord Med. Ark. Festband for Key.*)

Salomonsen et Madsen. Recherches sur la marche de l'immunisation contre la diphtérie *Annales de l'Institut Pasteur,* 1897, 1899.

RECHERCHES SUR LA TRANSFORMATION EXPÉRIMENTALE
DE BACTÉRIES BANALES EN RACES PARASITES DES PLANTES

Par M. L. LEPOUTRE

Travail du laboratoire de botanique de l'Institut agricole de Gembloux.

Chaque année, la liste des maladies bactériennes des plantes s'allonge, surtout chez les espèces soumises aux procédés de la culture intensive. Tandis que plusieurs naturalistes ont considéré les microbes qui causent ces affections comme spécifiques, d'autres, frappés de leur ressemblance avec les formes banales, ont été amenés à attribuer à celles-ci la propriété de devenir virulentes aux dépens des végétaux.

Dans cet ordre d'idées, M. Emile Laurent a montré que deux espèces communes, le *Bacillus coli communis* et le *B. fluorescens putidus*, normalement incapables d'attaquer les plantes, peuvent être rendues expérimentalement parasites très actifs de la pomme de terre, de la carotte et d'autres plantes tuberculeuses [1].

En est-il de même d'autres bactéries banales? Telle est la question à laquelle je me suis proposé d'apporter quelques faits nouveaux.

Mes essais ont porté sur les trois espèces suivantes : *Bacillus fluorescens liquefaciens*, *B. mycoïdes* et *B. mesentericus vulgatus*. — Les matériaux qui ont servi à ces recherches provenaient du même champ d'essais qui, en 1898, fournit à M. Laurent ceux qu'il employa pour ses études. Il est divisé en 5 parcelles: chaque année, l'une de ces parcelles, toujours la même, reçoit une dose excessive d'engrais azotés (P. I), ou d'engrais potassiques (P. II), ou de superphosphates (P. III), ou de chaux (P. IV), ou de chlorure de sodium (P. V).

Les microbes étudiés ont été ensemencés à la surface de tubercules sectionnés de pomme de terre ou de carotte placés dans des cristallisoirs fermés et maintenus à l'étuve à 30°.

La première tentative fut entreprise avec un *B. fluorescens*

1. Ces *Annales*, t. XIII, 1899.

liquefaciens trouvé dans une pomme de terre en pourriture et qui par conséquent avait déjà quelque virulence. Une culture sur bouillon gélatiné m'assura que c'était bien cette espèce.

Un peu de pulpe infectée fut déposée sur des rondelles de carotte. Au troisième jour, on voyait quelques taches noirâtres, glaireuses sur les rondelles de P. I et P. V; les autres étaient indemnes. Celles-ci furent alors rafraîchies et inoculées avec le produit d'attaque des rondelles de P. I. Après 2 jours, il n'y avait de développement que pour les carottes des P. I et V; l'attaque des tissus était plus prononcée que lors du premier passage, spécialement pour les racines de P. I.

Des navets provenant des 5 parcelles ont été ensuite inoculés avec le *B. fluorescens*, provenant du dernier passage sur carottes de P. I, avec du *B. mycoïdes* et du *B. mesentericus* cultivés en bouillon. C'est le premier de ces microbes qui s'est montré le parasite le plus actif et cela au bout de 24 heures à l'étuve. Quant aux racines de diverses origines, ce sont celles récoltées dans la P. I qui étaient les plus prédisposées à l'infection : elles étaient attaquées jusqu'à 5 millimètres de profondeur. Le parenchyme était complètement désagrégé et remplacé par une pulpe très molle et à réaction nettement alcaline.

Les *B. mycoïdes* et *mesentericus* n'ont causé qu'une légère attaque des navets et cela seulement trois jours après l'inoculation. Le développement était surtout marqué pour les navets des P. I et IV.

Avec les produits d'attaque de chaque bacille sur les racines de P. I, j'ai inoculé une nouvelle série de navets. 24 heures, plus tard, le *B. fluorescens* avait profondément (5 millimètres) attaqué les tubercules de P. I, puis venaient dans l'ordre d'altération ceux des P. IV, P. V, P. II et P. III.

Les 2 autres bacilles avaient attaqué les navets des P. I, IV, V, II et III, mais beaucoup plus faiblement que le premier.

Une troisième série d'ensemencements sur navets a donné, en 24 heures, une attaque générale jusqu'à une profondeur de 5 à 8 millimètres. Après 2 jours, quelques rondelles, épaisses de $0^{m},02$, étaient traversées de part en part; un liquide brunâtre, à odeur fétide, à réaction alcaline, s'écoulait au fond du cristallisoir.

Après 3 passages, les 3 bacilles étaient donc devenus

virulents, parasites pour les navets, surtout pour les racines cultivées dans les P. I et IV; celles de la P. III montraient une certaine résistance à l'infection. Il était manifeste que le *B. fluorescens* était le plus virulent des 3 espèces; les 2 autres forment à la surface de la section ensemencée une sorte de mycoderme assez épais, qui sans doute, empêche la pénétration de l'air dans les couches plus profondes et y entrave l'invasion des microbes.

Afin de conserver les 3 bacilles à l'état parasite, les essais furent continués sur des navets, mais sans présenter d'augmentation visible de la virulence; l'attaque du tissu cellulaire n'était pas plus rapide.

Les expériences suivantes ont été faites sur la carotte.

Des rondelles de racines de cette espèce, récoltées dans les 5 parcelles, furent ensemencées avec le *B. fluorescens* d'une culture antérieure sur carotte et avec les *B. mycoïdes* et *mesentericus* parasites de navets de P. I.

Après 24 heures, les bacilles n'avaient attaqué que les carottes des P. I et IV et, mais plus faiblement, les racines de P. V. Le *B. fluorescens* était le plus actif.

Le passage des deux autres bacilles du navet sur la carotte avait diminué leur virulence. Mais une deuxième série d'inoculations, en partant pour chaque espèce microbienne de ses produits d'attaque sur carotte de P. I, a donné un développement général sur les carottes de toutes les parcelles. L'altération était plus profonde sur les racines des P. I et IV et plus rapide avec le *B. fluorescens*.

Un troisième passage avait communiqué aux bacilles une puissance d'attaque telle qu'en 24 heures les carottes étaient décomposées sur une profondeur de plus de 5 millimètres. Les passages suivants ont encore augmenté la virulence. Celle du *B. fluorescens* était si grande que des rondelles de $0^{m},05$ d'épaisseur étaient toutes ramollies en quelques jours.

Les produits de la destruction des tissus, et le liquide brunâtre qui s'écoulait au fond des cristallisoirs avaient une réaction nettement alcaline. De plus, dans les bocaux de culture du *B. fluorescens*, je percevais une odeur d'ammoniaque très forte.

En résumé, les carottes et les navets qui avaient subi l'influence de doses élevées d'engrais azotés ou de chaux se sont montrées peu résistants à l'invasion parasitaire. Au contraire, l'emploi de l'acide phosphorique diminue la prédisposition à l'infection.

Ces résultats confirment ceux de M. Laurent pour le colibacille.

Les tubercules adultes de topinambour et la betterave à sucre paraissent naturellement immuns contre la pourriture provoquée par les microbes étudiés.

Des topinambours provenant des 5 parcelles ont été inoculés avec du *B. fluorescens* virulent sur carotte. Après 4 jours, les tubercules de P. IV seuls étaient faiblement attaqués; un second passage sur le même milieu n'a pas accru l'aptitude parasitaire.

Des essais d'inoculation furent tentés sur des betteraves, sans aucun résultat. Mais l'immersion de ces racines dans une solution de soude à 1 0/00 les a rendues favorables au développement du *B. fluorescens*. Une inoculation ultérieure sur betterave normale n'a plus donné qu'une attaque minime. L'immunité de la betterave est donc bien réelle.

Un accident survenu pendant l'été a fortement réduit la récolte des pommes de terre cultivées dans le champ d'essais. Je n'ai pu les utiliser pour ces expériences, et me suis servi de tubercules de variétés fourragères cultivées dans les champs.

La pulpe de carottes et de navets attaqués par les 3 bacilles a été employée comme produit d'inoculation, sans donner de résultat positif. J'ai alors eu recours au moyen artificiel imaginé par M. Laurent pour diminuer l'immunité naturelle. Il consiste à immerger pendant une heure les moitiés de tubercules dans de la soude à 1 0/00. L'inoculation fut suivie après 24 heures de séjour à l'étuve d'une destruction du parenchyme jusqu'à 3 et 5 millimètres de profondeur. Au bout de 2 jours, l'attaque du *B. fluorescens* atteignait 15 millimètres et celle des deux autres bacilles 8 à 10 millimètres.

Des pommes de terre normales, coupées en deux, ont été ensemencées avec les trois bacilles cultivés sur tubercules plongés dans la soude. Dès le lendemain, le *B. fluorescens* avait produit

une pulpe de 5 millimètres d'épaisseur; le *B. mycoïdes* et le *B. fluorescens* avaient donné une sorte de mycoderme, comme sur navets et carottes.

Les passages ultérieurs sur pommes de terre ont accru la virulence des 3 espèces, parmi lesquels la plus active était toujours le *B. fluorescens;* ses aptitudes parasitaires sont remarquables, et elle est sans conteste un ennemi très dangereux de beaucoup de plantes cultivées.

Les pommes de terre employées provenaient de variétés différentes et de divers champs. Aussi plusieurs tubercules furent rebelles aux premières tentatives d'inoculation; après une accoutumance suffisante sur des variétés moins résistantes, les plus récalcitrantes ont fini par se laisser entamer.

La réaction de la pulpe produite par l'invasion bactérienne et le liquide qui s'écoulait des tubercules pourris étaient toujours alcalins. La pulpe du *B. fluorescens*, examinée au microscope, montrait les cellules complètement dissociées, mais les grains d'amidon étaient intacts. Avec les *B. mycoïdes* et *mesentericus*, beaucoup de cellules n'étaient pas désagrégées; aussi la pulpe était plus ferme, grumeleuse.

Quand la pourriture était assez avancée, l'odeur d'ammoniaque était très prononcée.

Mécanisme de l'invasion bactérienne. — Les observations suivantes ont été faites sur le *B. fluorescens*, la plus virulente des 3 espèces étudiées.

Si l'on observe en mars une pomme de terre ou un navet inoculé, on peut aisément s'assurer que si la pulpe est alcaline, le tissu immédiatement sous-jacent a une réaction acide. Cette zone est privée de microbes, mais néanmoins le protoplasme des cellules est contracté. J'observais même un commencement de désagrégation de ces dernières. Il semble que de la région envahie par les microbes s'infiltrent des produits solubles acides qui dissolvent les lamelles mitoyennes et coagulent le protoplasme.

Le suc exprimé de navets infectés par le bacille a été filtré sur bougie Chamberland; il était brunâtre et avait une réaction alcaline. Une partie du liquide filtré fut neutralisé avec l'acide chlorhydrique dilué, et on en fit 3 portions. A la première (A),

on ajouta 2 0/00 d'acide oxalique; à la deuxième (B), un peu d'eau de chaux; la troisième portion (C) fut chauffée à 62° pendant cinq minutes. Dans les trois liquides ainsi préparés furent plongés de petites tranches de carotte, de navet et de pomme de terre; une goutte d'essence de moutarde les préservait de l'invasion microbienne.

Deux heures plus tard, en A et B, le tissu superficiel était désorganisé, et il se détachait une mince couche pulpeuse des tranches de tubercules. Le protoplasme était contracté dans les cellules.

Dans C, les tissus étaient restés compacts, mais le protoplasme était contracté plus nettement qu'en B.

Nous retrouvons ici les 2 agents signalés par M. Laurent : une diastase qui dissocie les cellules et des substances qui en contractent le protoplasme. Celle-là est détruite à 62° et fonctionne mieux chez le *B. fluorescens*, en milieu acide; celles-ci résistent au chauffage à 62°.

Des observations analogues furent faites avec le suc exprimé de pommes de terre attaquées, suc donc la réaction était aussi alcaline. Il renfermait une diastase qui dissout les lamelles mitoyennes de la pomme de terre en présence d'acide lactique et surtout d'acide acétique à 1 0/0; en même temps il y avait coagulation du protoplasme. Les effets de l'addition des acides formiques et tartrique, à la même concentration, sont plus lents sur la dissociation cellulaire et nuls sur la coagulation protoplasmique. Le même liquide, additionné de soude à 1 0/0 ou chauffé à 62°, ne modifiait plus la consistance du parenchyme de la pomme de terre.

L'existence de la diastase dissolvante des corps pectiques qui constituent les lamelles mitoyennes a été mise en évidence par la précipitation par l'alcool du liquide filtré des cultures sur pomme de terre.

Le précipité floconneux dissous dans l'eau produit le ramollissement et la désagrégation des membranes.

L'analyse du même liquide y a révélé l'existence des acides acétique et lactique. Ces acides ont aussi été retrouvés dans une culture du *B. fluorescens* en solution minérale additionnée de sucre à 1 0/0.

Nous savons déjà que, dans un tubercule de navet ou de

pomme de terre infecté, il existe sous la pulpe une couche de parenchyme, à réaction nettement acide et qui n'est pas encore envahie par les microbes, mais dont le protoplasme est déjà contracté. Cette altération doit être attribuée à des produits solubles, acides, sécrétés par les organismes de la pulpe, et parmi lesquels on est autorisé à ranger les acides acétique et lactique produits aux dépens des sucres de réserve.

A la dose de 1 0/0, ces acides organiques ne déterminent pas la contraction cellulaire chez la pomme de terre et le navet, mais bien chez le topinambour, la carotte et l'oignon. Cette dose n'est sans doute jamais atteinte dans les parenchymes situés à la limite des tissus contaminés; d'autres produits de sécrétion ajoutent leur action toxique à celles de ces acides et déterminent la mort des cellules avant la pénétration des microbes. Pour que celle-ci puisse avoir lieu, il faut la désagrégation cellulaire causée par la diastase également sécrétée par les bactéries, et dont la diffusion paraît moins rapide que celle des substances toxiques. Il n'est pas sans intérêt de remarquer que, dans le cas du *B. fluorescens* cultivé sur pomme de terre ou navet, la diastase qui dissout les lamelles mitoyennes ne fonctionne qu'en milieu acide ou faiblement alcalin.

Si la pulpe formée par les restes des parenchymes attaqués par les bactéries actuelles devient alcaline, c'est par suite des produits de décomposition des matières azotées renfermées dans les cellules. Il se forme ainsi de l'ammoniaque, qui neutralise les acides. La présence de cet alcali est évidente : on en perçoit nettement l'odeur dans les cultures et on peut le mettre en liberté par distillation avec la potasse.

L'intervention de l'ammoniaque est nécessaire pour empêcher l'action toxique des acides organiques que les bactérées produisent en décomposant les sucres, action qui se superpose à celle des acides du suc cellulaire. Ainsi, peut s'expliquer la prédisposition que présentent les tubercules récoltés dans la parcelle I, où l'on emploie chaque année des engrais azotés. Une pareille alimentation provoque une assimilation plus importante des combinaisons azotées, substances albuminoïdes, amidées ou autres, toutes très favorables à la nutrition des bactéries et à la production de combinaisons ammoniacales résiduaires.

Récemment, M. Pétermann [1] a attiré l'attention sur la richesse des tubercules en matières azotées non albuminoïdes, chez des variétés de pomme de terre très sujettes au Peronospora. Au contraire, les variétés qui renferment beaucoup de fécule et peu de matières azotées non albuminoïdes sont très résistantes à la maladie.

C'est une nouvelle preuve des relations qui existent entre la composition des plantes, leur alimentation et le développement de leurs parasites.

Cette dépendance des parasites vis-à-vis de la composition chimique de leurs hôtes doit être vraie aussi bien pour les matières minérales que pour les substances organiques, pour les hydrates de carbone comme pour les combinaisons azotées. En voici un nouvel exemple.

Au mois d'avril 1901, mes cultures du *B. fluorescens* navet périclitaient; il en fut de même pour des cultures de cette espèce faites en mai, sur pommes de terre de variétés diverses. L'immersion des tubercules dans des solutions alcalines ne communiquait qu'une virulence passagère : ils étaient immunisés, rebelles à l'infection. Il n'en fut plus de même quand, au commencement de juin, je pus répéter mes essais d'inoculation sur des pommes de terre nouvelles. Le microbe, après un premier passage sur tubercule alcalinisé, était redevenu actif, quelques passages sur des pommes de terre normales lui rendirent toute sa virulence.

On ne peut expliquer l'immunité acquise au printemps par les navets et les pommes de terre que par l'épuisement des réserves sucrées utilisées par la respiration et la croissance des tiges. Le *B. fluorescens*, incapable d'attaquer l'amidon, ne peut plus se multiplier et produire les substances toxiques qui tuent les parenchymes des tubercules. Ici l'immunité résulte d'un appauvrissement de l'hôte.

CONCLUSIONS

Les résultats généraux de ce travail confirment les conclusions posées par M. Em. Laurent dans ses recherches sur le colibacille :

1, *Bull. de l'Institut chimique et bactériologique à Gembloux*, n° 70, p. 15, 1901.

1° Par une série de passages, il est possible de faire acquérir à des bactéries banales (*Bacillus fluorescens liquefaciens*, *B. mycoïdes*, *B. mesentericus*) une réelle virulence à l'égard des tissus végétaux; cette propriété disparaît par la culture en milieu non vivant;

2° L'alimentation minérale influe d'une façon évidente sur la résistance des végétaux tuberculeux à l'infection bactérienne. C'est ainsi qu'un excès d'engrais azoté ou de chaux prédispose à la pourriture tandis que les phosphates augmentent la résistance des navets et des carottes aux bacilles virulents;

3° Pour ce qui concerne spécialement le *B. fluorescens*, il y a lieu de distinguer dans son rôle parasitaire : *a*, une action dissolvante des lamelles mitoyennes, due à une diastase, une variété de pectinase et qui produit la dissociation des cellules; *b*, une action coagulante, puis nécrosante sur le protoplasme provoquée par les produits de sécrétion du microbe, parmi lesquels sont des acides organiques; ils agissent comme de véritables toxines.

ERRATA DANS L'ARTICLE DE M. J.-G. SAVTCHENKO

(Numéro du 25 février.)

Page 107. — Ligne 14. — Lire « R. Pfeiffer » et non « Pfeffer. »
Page 117. — Ligne 28. — Lire « 3 c. c. de bouillon et de sérum fixateur » et non « 3 c. c. de bouillon ».
Page 119. — Ligne 26. — Lire « sérum normal de lapin » et non « sérum normal de cobaye ».
Page 123. — Ligne 37. — Lire « mononucléaires » et non « polynucléaires ».

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

16me ANNÉE MAI 1902 N° 5

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ESSAI SUR LA BIOLOGIE DU BACILLE PYOCYANIQUE

PAR C. GESSARD.

J'ai montré, anciennement déjà, l'avantage qu'il y a à cultiver séparément en bouillon et en peptone [1] le bacille pyocyanique, pour dissocier ses fonctions chromogènes, caractériser ses races et ses variétés et, sous les divers aspects qu'impriment aux cultures les différences de germes et de milieux, reconnaître l'identité de l'espèce. Tel germe qui, en bouillon, ne donne qu'une fluorescence verte (race F), tel autre qui n'y donne pas de pigment (race S), donnent de la pyocyanine dans la solution de peptone. Inversement, un germe peut ne produire que du rouge-brun [2] dans ce dernier milieu (variété mélanogène), qui fera de la pyocyanine dans la culture en bouillon. D'autre part, l'expérience suivante, en milieux salins de composition connue, montre à quels éléments simples, dans les milieux complexes précités, se rattache la production de deux de ces pigments. Un germe pyocyanique de la variété mélanogène ne fait que de la pyocyanine dans la solution :

Succinate d'ammoniaque	2 grammes.
Sulfate de magnésie	2 gr, 50
Chlorure de calcium cristallisé	1 gr, 25
Eau distillée	1.000 c. c.

Dans le même milieu additionné de phosphate de soude ou de potasse bibasique (5 gr.), il ne fait que de la fluorescence.

1. Peptone de préparation spéciale, dont j'ai donné la formule, ces *Annales*, t. VI, 1892, p. 807, et *Bulletin médical*, 1899, n° 55, p. 650.

2. Ce n'est pas le cas avec le germe mélanogène qui m'a servi, et dans la solution de peptone à 2 %: de la pyocyanine s'y montre avant le pigment rouge-brun. Celui-ci apparaît d'emblée, si l'on force la dose de peptone dans la solution. On conçoit, d'autre part, qu'un germe plus énergiquement mélanogène pourrait produire ce dernier effet avec la dose ordinaire.

Dans le même milieu additionné de tyrosine (0,5), il ne fait que du pigment rouge-brun[1].

***

Mais ni les milieux salins, ni le bouillon et la peptone pris séparément n'entrent dans la pratique courante des laboratoires de bactériologie.

On s'y préoccupe, avant tout, de constituer un milieu banal en rapport avec les indications nombreuses, tirées des sources multiples où puisent les investigations bactériologiques; on vise à réaliser dans ce milieu la plus grande somme d'éléments nutritifs, pour satisfaire aux exigences variées du plus grand nombre d'espèces qui peuvent se rencontrer. Pour cela, bouillon et peptone sont communément associés. Voyons donc comment réagit ce milieu complexe aux différents germes pyocyaniques.

La culture en bouillon peptoné offre trois types, caractérisés par les pigments qui y apparaissent. Ce sont :

1° Culture à pyocyanine seule[2];

2° Culture à pyocyanine et fluorescence[3];

3° Culture à pigment rouge-brun, qui se montre à la suite ou à l'exclusion des autres pigments[4].

Trois types de bacilles correspondent aussi à ces trois aspects des cultures en bouillon peptoné. Ils peuvent se caractériser déjà, rappelons-le, dans le bouillon ou la peptone employés séparément. Ce sont :

1. Il faut, pour reproduire cette expérience, ne pas perdre de vue les contingences d'où son succès dépend et où j'ai insisté dans un travail précédent (ces *Annales*, t. XV, 1901, p. 319). On ne s'attachera donc pas obstinément au chiffre de 2 grammes de succinate d'ammoniaque, bon pour le germe mélanogène qui m'a servi. Mais, par tâtonnement, on cherchera la dose de succinate la plus propre à mettre en relief le triple aspect de cette expérience, très frappante sous la disposition des trois essais parallèles, simultanément ensemencés d'une égale quantité d'une même culture-mère, de bouillon par exemple.

2. Aboutissant de la race P qui ne donne que de la pyocyanine même en bouillon, et aussi de la race S qui n'y donne pas de pigment, mais dont le caractère spécifique, la production de pyocyanine se retrouve, grâce à la peptone du mélange. (Ces *Annales*, t. V. 1891, p. 70.)

3. Aboutissant de la race A qui fait les deux pigments même en bouillon, et aussi de la race F qui n'y fait que de la fluorescence, mais dont le caractère spécifique, la production de pyocyanine se retrouve, comme il est dit dans la note précédente.

4. Variété mélanogène qui, faute de tyrosine en quantité suffisante dans le bouillon, n'y donne pas de pigment rouge-brun et ne s'y différencie donc pas de la variété pyocyanique ordinaire, mais y peut offrir les caractères d'une des quatre races de cette dernière mentionnées dans les deux notes précédentes.

1° Le bacille P, exclusivement pyocyanogène en bouillon ;
2° Le bacille A, pyocyanogène et fluorescigène en bouillon ;
3° Le bacille mélanogène en peptone.

Tous trois se rencontrent dans les conditions naturelles. Nous aurons à revenir sur cette origine. Voyons d'abord les résultats des tentatives qui ont été faites pour réaliser expérimentalement l'un ou l'autre de ces types.

* * *

D'après le sens où s'exerce le plus souvent notre intervention expérimentale, quand elle se confine *in vitro* et ne recourt pas à la collaboration des milieux vivants, nous devons trouver qu'entre nos mains un germe pyocyanique aura perdu quelqu'une de ses fonctions chromogènes plutôt qu'il n'en aura acquis de nouvelle. En effet, les tentatives dans cette dernière direction sont restées infructueuses. M. Edwin O. Jordan, dans une étude approfondie du bacille pyocyanique, a multiplié sans succès les expériences, en vue de faire naître ou d'accroître le pouvoir pyocyanogène chez des germes qui étaient dépourvus de ce pouvoir ou qui ne l'offraient qu'à un degré restreint. Le même savant n'a pas mieux réussi à donner le pouvoir fluorescigène à un bacille pyocyanique qui ne le possédait pas, malgré une série de cultures dans des milieux particulièrement favorables à la production de la fluorescence[1]. J'ai également échoué, de mon côté, quand j'ai entrepris autrefois d'exalter, au regard du bouillon, la fonction fluorescigène d'un germe qui y produisait fluorescence et pyocyanine, et que, dans ce dessein, j'ai fait une longue série de cultures de ce germe dans l'albumine d'œuf, qui est le milieu naturel le plus favorable à l'exercice de cette fonction fluorescigène. Le germe, mis de la sorte en demeure de ne produire que de la fluorescence pendant toute une année, quand il fut reporté au bout de ce temps dans le bouillon, n'y a plus fait dès lors que de la pyocyanine [2]. C'est l'origine de ma race P. On voit qu'elle représente une dégradation de la race A ; elle correspond, comme nous avons dit, au type 1 des cultures en bouillon peptoné.

1. Edwin O. Jordan, de l'Université de Chicago. Bacillus pyocyaneus and its pigments. *Journal of Experimental Medicine*, 1899, n°s 5-6, p. 633 et suivantes.

2. Ces *Annales*, t. V, 1891, p. 70.

En possession du bacille de la variété mélanogène qui, en plus de pyocyanine et fluorescence, produit le pigment rouge-brun, je me suis demandé s'il ne serait pas possible de le dégrader aussi, de lui faire perdre, par exemple, cette dernière faculté, et de le ramener ainsi au type de la variété pyocyanique ordinaire. Pour bien augurer des tentatives dans ce sens. je n'eus qu'à me rappeler le fait d'atténuation progressive du pouvoir mélanogène[1], que j'avais vu spontanément survenir dans un de ces germes, au cours des ensemencements réitérés dont il avait été l'objet. C'est ce germe même que j'ai choisi pour tenter, par un moyen artificiel, d'achever l'œuvre de dégradation déjà en voie d'élaboration spontanée. Le moyen auquel j'ai eu recours, c'est la chaleur, qui m'a déjà servi autrefois à dépouiller de ses fonctions chromogènes le bacille pyocyanique ordinaire. Il m'a suffi de chauffer 5 minutes à 54°[2] une culture en bouillon du germe mélanogène susdit, pour le rendre inapte désormais à faire le pigment rouge-brun[3], même dans les milieux pourvus de tyrosine, qui en fournit la matière première.

Ainsi. à partir de sa plus grande complexité fonctionnelle, qui se manifeste en bouillon peptoné par la production de trois pigments, le rouge-brun, le fluorescent, le pyocyanique, le bacille peut être réduit, par degrés. à ne plus produire dans ce milieu que deux pigments, le fluorescent et le pyocyanique,

1. L'atténuation du pouvoir mélanogène se mesure, je le rappelle, à la quantité de succinate d'ammoniaque dont l'influence est antagoniste, dans la culture en milieu salin, de celle de la tyrosine, et tend à faire prédominer les pigments pyocyaniques ordinaires sur le pigment rouge-brun lié à cette dernière. Plus l'atténuation est poussée, moins est grande la quantité de succinate d'ammoniaque à opposer à la quantité constante de tyrosine de 0,50/00 du mélange.

2. Je ne donne aussi ce chiffre pour valable que relativement à mes expériences et au germe qui m'a servi. A prendre, comme valeurs absolues, les chiffres des températures qui m'ont réussi autrefois pour obtenir des effets de dégradation analogues sur le bacille pyocyanique ordinaire, des expérimentateurs ont échoué dans leurs tentatives pour reproduire ces effets à ces mêmes températures. Le degré de température efficace varie avec le germe, le milieu de culture, etc. Aussi faut-il procéder par tâtonnement, successivement à des températures différentes écartées d'un degré environ, et retenir, pour l'essayer au point de vue des fonctions, le germe qui a subi la température immédiatement inférieure à celle qui abolit la vitalité elle-même. Le chauffage porte chaque fois sur le contenu de la partie effilée d'un tube à ensemencer, qui n'est fermé que par une ouate à la partie supérieure.

3. Le chauffage, dans mon expérience, a fait perdre au germe, du même coup, la fonction pyocyanogène au regard du bouillon : d'où il s'est trouvé bacille pyocyanique ordinaire de race F. Nous retrouverons plus loin mention de la fragilité de cette fonction pyocyanogène dans le bouillon, en comparaison de la fluorescigène.

puis un pigment unique, le pyocyanique, d'ailleurs spécifique et sans lequel le bacille pyocyanique ne peut-être identifié [1].

Quelle importance a chacune de ces fonctions chromogènes, en soi et relativement aux autres? Quelle place occupe chacune d'elles dans la biologie du bacille pyocyanique et comment peut-on concevoir cette biologie ? C'est ce que j'examinerai dans les lignes qui suivent.

II

Je rappellerai d'abord les circonstances naturelles où se sont rencontrés les types pyocyaniques d'inégal pouvoir chromogène, qui correspondent à ceux que l'expérimentation a mis en œuvre ou réalisés.

Commençons par le bacille mélanogène. Sa fonction chromogène caractéristique est la mieux connue, en tant que ce « phénomène vital a été réduit à une explication physico-chimique bien déterminée ». (Cl. Bernard.) Nous savons que le pigment rouge-brun est dû à la présence de la tyrosine dans les milieux de culture et à la transformation de cette tyrosine par une diastase oxydante, la tyrosinase, que le microbe sécrète et qui est bien connue par ailleurs [1]. Nous pouvons aussi bien dire à quel temps ce pigment rouge-brun est apparu pour la première fois dans la biologie du bacille pyocyanique. Il date

1. Je n'ignore pas que MM. Charrin et Phisalix ont poussé la dégradation encore plus loin, et que, par une série de cultures à la température de 42°,5, ils ont amené le bacille pyocyanique à ne plus produire de pigment, même dans les milieux propices et aux températures eugénésiques. (*Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, t. CXIV, 1892, p. 1565.) Mais je ne crois pas que, en dehors de son intérêt doctrinal, ce fait ait une portée pratique, ni qu'il permette d'inscrire un type nouveau à la suite des trois types de bacilles, caractérisés comme il est dit ci-dessus. Un germe dénué à ce point du caractère spécifique essentiel, la production de pyocyanine, et qui serait rencontré dans les conditions naturelles, ne saurait être revendiqué comme pyocyanique. Dans des conditions expérimentales qu'ils suivaient de près et sur lesquelles ils gardaient la haute main, MM. Charrin et Phisalix ont pu légitimement invoquer, « pour démontrer que ces cultures décolorées étaient bien dues au bacille pyocyanique, les symptômes et les lésions engendrés par l'inoculation aux animaux ». Mais symptômes et lésions ne sont pas à ce point pathognomoniques dans la *maladie pyocyanique* de l'animal ou de l'homme, qu'ils permettent d'identifier, à défaut du pigment spécifique, le bacille pyocyanique. Puisque nous avons la bonne fortune qu'une espèce microbienne possède en propre un caractère si tranché et si facile à reconnaître, nous devons maintenir la prétention rigoureuse que ce caractère soit préféré à tous autres d'interprétation forcément plus personnelle, pour identifier, en toute occasion, les germes de cette espèce.

2. Ces *Annales*, t. XV, 1901, p. 593 et 817.

du cas clinique où M. le docteur Cassin découvrit le nouveau microbe, et de l'étude bactériologique du microbe par M. Radais[1], lequel y reconnut un bacille pyocyanique que différenciait la production de ce nouveau pigment. Le cas est resté isolé dans la science. La singularité du fait, aussi bien que le caractère inédit et la soudaine révélation d'une propriété si curieuse dans une espèce microbienne qui a fait l'objet de si nombreux travaux et qui est d'ailleurs si connue, tout cet ensemble de données m'a conduit à rattacher ce progrès fonctionnel aux circonstances mêmes où le microbe s'est rencontré. J'ai pensé qu'un germe pyocyanique ordinaire s'est trouvé dans des conditions particulières et nouvelles de conflit avec un organisme vivant, un être humain dans l'espèce, d'où lui est venue cette *virulence* nouvelle et d'application si spéciale, si je peux employer cette expression par une assimilation qui me paraît légitime entre ce cas particulier d'accroissement des facultés microbiennes et les autres cas couramment observés où cette expression trouve son habituel emploi.

M. James Kunz [2] a été le premier, sinon à constater la fluorescence des cultures pyocyaniques, du moins à l'attribuer à l'existence d'un pigment distinct. Une belle fluorescence verte, due au mélange de la pyocyanine et de ce pigment fluorescent (*pyofluorescéine* de l'auteur), forme l'aspect habituel des cultures en bouillon peptoné de la plupart des germes pyocyaniques de diverses provenances. On sait que la production du pigment fluorescent est liée à la présence de phosphate dans le milieu de culture, sans que toutefois l'apparition de la fluorescence accompagne le phosphate aussi souvent que le pigment rouge fait la tyrosine [3]. Cette fluorescence a pour propriété de disparaître par les acides et d'être rétablie ou exaltée par les alcalis, et de prendre par oxydation, dans les vieilles cultures, une teinte feuille morte comprise entre le brun jaune et l'orangé. La coexistence de la pyocyanine et de la fluorescence dans les

1. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1897, p. 808.
Je dois à l'obligeance de M. le Dr Cassin de pouvoir publier l'observation de ce curieux cas clinique, rédigée par lui et encore inédite. (V. Appendice.)
2. *Corresp. Blatt f. Schweiz. Aerzte.*, t. XVIII, 1888, p. 79.
3. C'est ainsi qu'une coloration rouge accompagne l'oxydation de la tyrosine, que l'agent d'oxydation soit chimique (réactif de Millon) ou biologique (tyrosinase d'origine microbienne ou cryptogamique). J'ai constaté que l'ozone produit aussi la même coloration, mais qui est bientôt limitée par le pouvoir décolorant de ce gaz.

cultures semble le cas le plus fréquent, d'après les recherches bibliographiques auxquelles s'est livré M. E. Jordan[1], dans le même temps qu'il apportait son intéressante contribution à la connaissance du bacille exclusivement pyocyanogène, qui est celui qui va maintenant nous occuper.

J'ai pu rétrospectivement établir[2] que c'est un germe de ce type qui m'est échu, quand j'ai fait, il y a vingt ans, mes premières recherches sur le microbe des pansements bleus. Si, en effet, il ne m'était pas possible, à l'époque, d'assigner à ce germe son vrai rang dans la biologie du bacille pyocyanique, il n'était pas davantage possible que je méconnusse la fluorescence, si elle était apparue dans le milieu propice qui me servait, car je m'étais initié aux études bactériologiques précisément avec un microbe banal, producteur de ce pigment fluorescent. J'ai pu, grâce à M. Jordan, observer le germe de même race qu'il a étudié (*B. pyocyaneus*, Rush, de son mémoire) et qui a été trouvé dans le corps d'un cobaye, mort à la suite d'inoculation de membrane diphtéritique. Je lui ai trouvé les caractères connus du bacille exclusivement pyocyanogène P : il donne en bouillon peptoné une culture bleue ou verte sans l'éclat des cultures A, laquelle devient brun-rouge[3] en vieillissant. Ainsi ce type de bacille pyocyanique se rencontre également dans la nature, et il y serait même moins rare que ces deux exemples isolés ne feraient supposer : récemment M. F. P. Gorham[4] en signalait la fréquence dans le nez et dans la gorge à côté du bacille à deux pigments.

*
* *

1. *Loco citato*, p. 646.
2. Ces *Annales*, t. V, 1891, p. 75.
3. Brun-rouge bien différent de celui que donne le bacille mélanogène en présence de la tyrosine, et que, d'ailleurs, le mélanogène ne produit pas dans les conditions de milieu qui sont les plus favorables à sa production par le germe P.

M. G. W. Boland (*Centralblatt f. Bakteriologie*, t. XXV, 1897, p. 897) en a fait un produit de transformation de la pyocyanine dans les cultures, qui correspond à la pyoxanthose qu'elle donne dans d'autres conditions, et a mesuré, en effet, la décroissance progressive de la pyocyanine en corrélation avec l'accroissement progressif de ce pigment rouge, à mesure que la culture vieillit. Mais j'ai vu ce rouge apparaître par vieillissement des cultures en gélatine glucosée, où le microbe ne produit pas de pyocyanine, mais seulement une coloration jaune ou verdâtre. Je l'ai attribué dès lors à l'oxydation de ce pigment distinct, troisième pigment de mon mémoire de 1890, qui accompagne la pyocyanine dans les milieux et avec les germes qui ne donnent pas de fluorescence.
4. Second Meeting of the Soc. of American Bacteriologists, in Baltimore. *Centralblatt f. Bakteriologie*, t. XXIX, 1901, p. 495.

Nous devons nous demander maintenant : le bacille pyocyanique normal est-il le microbe doué des deux fonctions, pyocyanogène et fluorescigène, d'où le type exclusivement pyocyanogène serait dérivé, comme nous avons vu que c'est le cas dans les conditions expérimentales; ou bien le bacille, uniquement pyocyanogène d'abord, peut-il acquérir, du fait des circonstances, la propriété de faire de la fluorescence, comme nous avons vu que le bacille producteur des deux pigments a acquis une troisième fonction chromogène dans son séjour au sein d'un organisme vivant ?

Mais notons aussitôt que la fonction fluorescigène n'appartient pas en propre au bacille pyocyanique, qu'elle est commune à un grand nombre d'espèces dont M. Edwin O. Jordan a pu relever cinquante-deux en 1899 [1], et que dès lors notre question peut être transformée en la suivante : est-ce qu'un germe fluorescent banal a pu se spécifier et devenir apte à produire de la pyocyanine ; ou, encore une fois, est-ce un germe, seulement pyocyanogène à l'origine, qui est devenu pyocyanogène et fluorescigène?

Dans l'une et l'autre alternative, puisqu'il s'agit de l'acquisition d'une propriété nouvelle, nous sommes porté à penser qu'il a dû intervenir cette action physiologique d'un milieu vivant, à qui nous n'avons pu, jusqu'ici, trouver d'équivalent dans les ressources de l'expérimentation. D'autre part, si nous admettons que c'est la fonction fluorescigène du bacille pyocyanique qui a pris naissance par ce mécanisme, nous devons trouver même caractère adventice et même origine à cette fonction chez tous les microbes qui en sont pourvus.

Les circonstances. où la plupart de ces microbes ont été rencontrés, me paraissent militer en faveur de cette hypothèse. Car, si les titres, qui ont paru légitimer la création de tant d'espèces distinctes, sont d'inégale valeur et peuvent faire penser qu'une revision sévère réduirait notablement le nombre de ces espèces, la provenance et l'habitat pour chacune d'elles doivent être acceptés comme des titres d'autant plus authentiques qu'ils semblent, dans bien des cas, avoir prévalu sur les autres ou en avoir tenu lieu pour constituer des espèces fluorescentes nou-

1. Edwin O. Jordan, The production of fluorescent pigment by Bacteria. *Botanical Gazette*, Chicago, 1899, n° 1, p. 35.

velles. Or, on peut constater que ces germes fluorescents ont été le plus souvent retirés de quelque partie ou produit du corps de l'homme ou des animaux.

Et même, la revision susdite eût-elle pour effet (ce qui dépasse beaucoup ma pensée) de réduire tous les fluorescents aux deux seules espèces si nettement caractérisées par ailleurs, et comme il serait à souhaiter que le fussent toutes les autres, grâce à une fonction spécifique distincte, je veux dire le bacille cyanogène ou du lait bleu et le bacille pyocyanique, on voit assez, par ces deux exemples, que notre hypothèse sur l'origine animale de la fonction fluorescigène ne serait pas infirmée.

*
* *

Des conditions naturelles où nous apparaît le phénomène microbien de la fluorescence, passons aux conditions que nous avons été amené expérimentalement à réaliser ou à adopter de préférence pour entretenir *in vitro* les fonctions chromogènes des microbes. Au premier rang des milieux propices à la fluorescence vient l'albumine telle que l'offre le blanc d'œuf, ce milieu dès longtemps désigné par le développement spontané de la fluorescence verte, qui y a été signalée bien avant qu'on en connût la cause [1]. Le bacille pyocyanique doué des deux fonctions chromogènes n'y fait que de la fluorescence. Au contraire, celle-ci cesse de prédominer et tend même à disparaître, à mesure que cette matière albuminoïde est plus différente de ce qu'elle est à l'état naturel. C'est ainsi que, dans le bouillon, la pyocyanine peut se montrer à côté de la fluorescence. Toutefois ce milieu maintient encore l'avantage à la fonction fluorescigène sur la pyocyanogène, au point que cette dernière peut disparaître par le fait seul de la prolongation des cultures en série dans le bouillon, ce qui peut donner naissance à un représentant de la race F, qui ne fait que de la fluorescence dans ce milieu [2]. Enfin, dans la peptone de ma formule, où la matière

1. Schoenbein, 1864.

2. Cette dégradation spontanée d'un germe pyocyanique, qui n'y laisse plus subsister que la fonction fluorescigène, s'observe fréquemment dans les laboratoires, à la suite de nombreuses cultures en série. Et ces germes ainsi modifiés ont été cause d'erreurs, de la part d'observateurs qui en ont eu communication sans avoir suivi le procès de dégradation. Il n'est pas superflu de rappeler que la peptone, particulièrement la peptone gélosée et glycérinée, est le milieu d'élection pour la production de pyocyanine par les germes qui n'en font plus dans les autres milieux. Car peut-on concevoir, sans l'oubli de ce moyen si simple de diagnostic entre le bacille pyocyanique de race F et le bacille fluorescent liqué-

albuminoïde a subi une dégradation plus profonde, la fonction fluorescigène ne se retrouve plus et, seule, la fonction pyocyanogène subsiste.

Mais nous savons désormais que ce n'est pas la matière albuminoïde globale qui favorise la fonction fluorescigène, mais seulement l'élément qui est universellement associé à l'albuminoïde, le phosphate. Et quand nous avons substitué nos milieux salins à ces milieux albuminoïdes, nous avons bien vu, en effet, que, si la fonction pyocyanogène se contente du milieu minéral le plus pauvre, partant le plus rapproché des conditions de la vie saprophytique, la fonction fluorescigène veut en plus, pour se manifester, l'introduction dans ce milieu d'un de ces phosphates, « les plus physiologiques des sels minéraux » (Duclaux), et par là témoigne encore de ses relations originelles avec les milieux vivants.

Le rapprochement s'impose ici avec ce qu'on constate, d'autre part, pour la production des toxines, qui est la fonction du bacille pyocyanique dont on peut le moins contester qu'elle s'acquiert ou s'exalte par le passage du microbe dans le corps des animaux vivants. Le bacille, devenu ainsi pathogène, ne donne naissance à ses toxines dans les cultures *in vitro*, que si le milieu est suffisamment riche en principes albuminoïdes[1], et cette fonction particulière, plus exclusive que la fonction fluorescigène, ne s'accommoderait pas, comme celle-ci, des milieux salins phosphatés pour succédanés des albuminoïdes.

***

Cette faculté d'acquérir des propriétés nouvelles dans certaines conditions de milieu, qui est une notion bien ancienne pour la virulence et dont la fluorescence me paraît offrir un nouvel exemple, témoigne d'une puissance d'évolution microbienne qu'il est difficile de croire bornée à ces termes. Nous voyons, d'autre part, que le microbe chromogène peut être

fiant, que de longues recherches aient été consacrées à leur trouver des caractères distinctifs dans la forme de liquéfaction de la gélatine, la température de croissance, etc.? Que penser aussi des germes pyocyaniques mis en expérience, sinon des expériences elles-mêmes, dans des recherches qui concluent à l'impossibilité d'obtenir de la pyocyanine et qui en infèrent que la couleur bleue des cultures n'est que celle qui apparaît dans tout liquide légèrement trouble, et est imputable à un phénomène de réfraction de la lumière! M. A. Christomanos a récemment fait justice de ces étranges assertions. (*Zeitschrift f. Hygiene*, t. XXXVI, 1901, p. 258.)

1. Charrin et Dissard, *Mémoires de la Soc. de Biologie*, 1893, p. 182.

amené à ne plus produire aucun pigment ; nous concevons, par suite, la vie comme indépendante de la fonction, et nous sommes conduit à nous demander si elle n'a pas devancé cette dernière; si, de même qu'il dépouille la fonction chromogène, le microbe ne l'a pas revêtue à un moment donné; si, en un mot, pour la fonction pyocyanogène elle-même, où nous réduisons la propriété essentielle du bacille pyocyanique, des influences de milieu n'ont pas déterminé son apparition dans un germe primitivement incolore. Mais c'est la question même de l'origine de l'espèce qui se pose ainsi, aussi bien que lorsqu'on discutait jadis la possibilité de la transformation du bacille du foin en bactéridie charbonneuse. Il convient d'autant mieux d'écarter de ces questions les considérations théoriques et de laisser la parole aux faits, que la microbie paraît la science qui peut le mieux permettre l'étude expérimentale des questions d'évolution. Aussi je me contente de signaler ce point de vue en passant.

***

Revenons à la fonction fluorescigène, pour rappeler un fait qui me semble en faveur de l'origine animale que je lui attribue. J'ai vu autrefois que cette fonction subsistait seule dans un germe qui faisait primitivement fluorescence et pyocyanine, après que ce germe avait séjourné quarante-huit heures dans le corps d'un lapin[1]. Ainsi la fonction s'est maintenue, à l'exclusion de toute autre, dans les conditions qui lui ont donné naissance.

Mais on serait en droit de demander davantage à l'expérimentation, et notamment qu'elle sanctionnât nos vues en faisant apparaître cette fonction fluorescigène dans un germe qui ne la possède pas primitivement. J'ai également une ancienne expérience qui, si elle visait un autre point, ne rentre pas moins dans les données du problème actuel. Un germe exclusivement pyocyanogène, de la race P obtenue par le moyen que j'ai rappelé plus haut, fut introduit dans la circulation d'un lapin; seulement, ce fut un bacille incolore qui fut retiré du cadavre de l'animal[2]. Mais on peut dire que cette expérience péchait par la base même : elle mettait à contribution un germe dont le caractère unifonctionnel, d'après ses origines, résultait d'un

1. Ce fut une des origines de ma race F.
2. Ce fut une des origines de ma race S.

procès de dégradation[1], au lieu d'être l'attribut primordial du microbe primitif, comme ce devrait être le cas pour le bacille employé à cette expérience.

Mais, quand même nous aurions introduit dans un organisme animal le germe approprié, l'expérience implique, à partir de ce moment, trop d'inconnues, elle procède d'un déterminisme dont nous sommes trop peu maître, pour que nous nous croyions autorisé à faire fonds sur ses résultats, quels qu'ils puissent être. Considérons, d'ailleurs, que l'influence que nous attribuons à la vie parasitaire du microbe sur sa fonction chromogène, ne présente pas un tel caractère de nécessité qu'elle s'exerce, à coup sûr, même dans les conditions qui paraissent les plus favorables. (Cas du bacille isolé par M. Jordan.)

Remarquons enfin combien la manifestation de la fonction mélanogène elle-même, dont l'origine animale est bien avérée, s'est montrée tardive et isolée dans la série infinie des générations pyocyaniques et dans le grand nombre de cas de vie parasitaire du microbe, qui ont pu s'offrir, depuis si longtemps déjà, à tant d'observateurs de tous les pays.

III

La fonction mélanogène du bacille pyocyanique a été manifestement acquise dans un milieu vivant. Par les considérations développées dans les pages qui précèdent, je conclus qu'il en est de même pour la fonction fluorescigène. Les conclusions de mes études sur le bacille pyocyanique sont les suivantes :

Le bacille pyocyanique a, pour propriété essentielle et spécifique, la production de la pyocyanine. Celle-ci peut manquer, dans certains cas, du fait du milieu. Le milieu spécial avec la peptone permet toujours de la retrouver et, par là, de reconnaître le microbe. Ce pigment est surtout en rapport avec les conditions de la vie saprophytique.

Dans certaines conditions de vie parasitaire dans un orga-

1. M. Jakowski (*Zeitschrift f. Hygiène*, t. XV, 1893, p. 484) a reconnu, en effet, que le succès de mon expérience de la perte du pouvoir chromogène par passage dans le corps des animaux nécessitait préalablement un commencement de dégradation du microbe, qui résultait, dans ses expériences, d'ensemencements réitérés en milieu artificiel : des cultures de quatre jours des n°s 9 et 12 d'une série perdaient leur pouvoir chromogène par le passage dans les animaux, ce qui n'arrivait pas avec les cultures de même âge du n° 3 de la série.

nisme vivant, le bacille pyocyanique peut acquérir la propriété de faire en dehors de cet organisme, *in vitro* :

Un pigment fluorescent, moyennant que le milieu artificiel contienne un phosphate ;

Un pigment rouge-brun, moyennant que le milieu artificiel contienne de la tyrosine ;

Des produits toxiques et pathogènes, moyennant que le milieu artificiel contienne des matières albuminoïdes. (Charrin.)

Le bouillon peptoné satisfait à ces exigences diverses. Les cultures du bacille pyocyanique y montrent le plus souvent pyocyanine et fluorescence associées, parce que, comme nous l'avons vu, le microbe doué des deux pouvoirs chromogènes est le plus fréquent, et que le bouillon peptoné offre en quantité suffisante et sous des proportions qui se font sensiblement équilibre les deux éléments dont l'influence se balance en faveur de l'un ou l'autre pigment : le phosphate nécessaire à la fluorescence, la matière azotée qui suffit à la pyocyanine. Cet équilibre est près d'être rompu dans le bouillon simple, et c'est au profit du phosphate ; il en résulte un réactif, peut-on dire, plus sensible que n'est le bouillon peptoné, pour révéler, si faible qu'elle soit, l'inégalité d'aptitude des différents germes relativement à l'une et à l'autre fonction. Et ainsi nous avons pu constituer, au regard de ce bouillon simple, deux types de races qui ne se distinguent pas dans le bouillon peptoné : l'une qui n'y fait que de la fluorescence, F ; l'autre qui n'y fait pas de pigment, S. Mais nous sommes dès lors enclin à nous représenter finalement ces deux races comme étant respectivement des types de bacilles A et P, seulement à pouvoir pyocyanogène atténué, au point que le taux de phosphate du bouillon simple suffit à produire l'inhibition de cette dernière fonction, au profit de la fonction fluorescigène dans le premier cas, F, sous-variété de A ; sans compensation chromogène dans le second cas, S, sous-variété de P. La peptone dans le bouillon peptoné rend la faveur à la fonction pyocyanogène, d'où l'on n'y distingue plus que A et P[1]. Enfin, en peptone pure, où l'élé-

1. La fonction mélanogène, adventice chez le bacille pyocyanique doit entrer au même titre dans la biologie d'autres espèces microbiennes, comme c'est le cas pour la fonction fluorescigène. A ce point de vue, on devra chercher désormais, pour les divers microbes producteurs de noir, si la coloration des cultures n'est pas en rapport avec la présence de la tyrosine dans les milieux où le noir apparait.

ment azoté l'emporte de beaucoup, il n'est plus fait que de la pyocyanine par toutes les races.

*
* *

J'ajouterai quelques réflexions qui me sont inspirées par un travail récent, et que je n'ai connu qu'après la publication de mon mémoire sur le bacille mélanogène.

MM. Otto von Furth et Hugo Schneider[1] se sont attachés à démontrer que c'est la tyrosinase qui donne naissance, dans l'organisme animal, à la mélanine et à tous les pigments analogues. De fait, ils ont constaté la présence de la tyrosinase dans le sang des insectes et d'autres arthropodes, et M. Przibram l'a retrouvée dans les tissus de la poche de noir de la seiche. Ces savants pensent que deux sortes de ferments concourent à la formation des pigments mélaniques dans les tissus vivants : un ferment autolytique qui dégagerait de la matière albuminoïde la tyrosine ou un autre composé aromatique ; la tyrosinase ou un ferment analogue qui transformerait ces composés en produits mélaniques. J'ai abouti, de mon côté, à la conclusion que le bacille pyocyanique de la variété mélanogène associe la trypsine et la tyrosinase pour dégager la tyrosine et l'oxyder, et produire son pigment rouge[2] brun dans les milieux albuminoïdes. C'est un nouvel exemple de l'identité d'action physiologique entre les cellules des tissus des êtres vivants, qui ne sont aussi bien que des microbes agrégés et à divers égards dépendants, et les microbes qui sont des cellules libres et autonomes.

1. C'est seulement dans ces limites restreintes que je me trouve en conformité de vue avec les auteurs allemands, dont les travaux ont pour pivot le dualisme : Bacilles α et β, *Bacillus pyofluorescens* et *B. pyocyaneus*. Autrement, le bouillon reste-t-il la base des milieux nourriciers ? Au regard de ce bouillon, j'ai quatre germes qui se comportent différemment à travers une longue suite de générations : ils représentent bien quatre races. Elles se sont conservées, en effet, fixes dans leurs caractères, depuis onze ans que je les ai obtenues, et servent, chaque année, aux démonstrations et aux exercices pratiques de l'*Institut Pasteur*. — J'ajouterai, comme contribution à nos connaissances sur la durée de la vitalité des microbes sans spores, que des cultures en bouillon, dans de petits matras Pasteur, que j'avais ensemencées en janvier 1893, furent trouvées.

	Encore fertiles.	Mortes.
A.	11 décembre 1898 ;	2 février 1899 ;
F et P.	20 décembre 1896 ;	3 avril 1897 ;
S.	4 octobre 1897 ;	11 décembre 1898.

Ces constatations sont de M. le Dr Binot qui avait ces cultures dans ses collections, et qui en essayait régulièrement l'état de conservation. J'en dois la communication à son extrême obligeance.

2. *Beitraege zur chemischen Physiologie und Pathologie*, t. I, 1901, p. 229.

J'ai, d'autre part, exprimé déjà l'opinion que la fonction fluorescigène, elle aussi, doit se retrouver dans l'organisme de l'homme et des animaux, sans que je préjuge rien sur son rôle dans l'économie ; et j'ai volontiers admis que le sang de certains insectes [1], d'aspect et de réaction identiques à ceux de la fluorescence d'origine microbienne, offrait la première manifestation, à ma connaissance, de l'existence de cette fonction fluorescigène dans la série animale. Si ces vues se vérifiaient, il ne serait pas indifférent, pour l'idée que nous pouvons nous faire de l'évolution des fonctions microbiennes, qu'un double exemple nous fût ainsi acquis, où l'adaptation du microbe à une fonction nouvelle eût résulté du séjour de ce microbe dans un organisme vivant où cette fonction est normale, et peut-être même (il appartient à des recherches ultérieures d'élucider ce point) dans les parties mêmes de cet organisme où cette fonction s'exerce habituellement.

APPENDICE

Observation d'un sujet chez qui fut trouvé le bacille pyocyanique mélanogène.

Par M. le Dr Cassin.

Au mois d'août 1895, au cours de manœuvres et en saut d'obstacles, X..., officier de cavalerie, 39 ans, a la jambe droite violemment froissée entre le flanc de son cheval et celui d'un camarade.

Au débotter, il constate une meurtrissure sans plaie, produite par les boutons de la culotte, sur la face externe du mollet ; le lendemain, large ecchymose dans cette région, sensation de douleur profonde, mais pas d'interruption de service.

A quelque temps de là, il se découvre, par hasard, dans la zone contuse, dont l'aspect était normal, une induration « comme un furoncle »; il s'ouvre sans avoir été douloureux (décembre 1895). Puis, autour du premier bouton, il s'en forme de nouveaux qui, comme lui, s'indurent et s'ulcèrent sans réaction; le médecin du corps prescrit un pansement à l'iodoforme et de l'iodure de potassium à l'intérieur, à continuer pendant plusieurs mois; il défend le port de la botte, par conséquent l'exercice du cheval.

En mai 1896, la situation demeurait stationnaire, notre officier se résigne à un mois de repos absolu, dont l'effet salutaire est immédiat ; mais, impatient et actif, il reprend son service avant la guérison complète et les plaies à peine cicatrisées s'ouvrent à nouveau.

1. Raphael Dubois, *Les Élatérides lumineux*, 1886, p. 217-218.

En juillet et août, cure à la Bourboule sans résultat; de nouvelles indurations se montrent et s'ulcèrent au-dessus de la cheville, sur la tête du péroné.

Pendant l'automne, les traitements les plus variés sont mis en œuvre; le malade garde un repos relatif, fait toujours quelques pas, sort en voiture; la diffusion se poursuit, mais les lésions primitives demeurent stationnaires.

Le malade se confie à mes soins le 2 janvier 1897.

C'est un homme de belle apparence, grand, blond, bien musclé, mais à peau fine et sèche, presque ichthyosique. Il n'accuse aucune infection antérieure, ni syphilis, ni alcoolisme; il est marié, a trois enfants vivants, sa femme n'a jamais eu de fausses couches; issu d'une nombreuse famille, il a encore son père; la mère est morte à la ménopause (?), une de ses sœurs a été enlevée par la tuberculose pulmonaire à 24 ans.

Malgré la longue période d'inactivité qu'il traverse, sa santé générale est demeurée bonne; sommeil, digestion, état des forces, tout est normal; les urines examinées à plusieurs reprises n'ont jamais donné de sucre ni d'albumine.

La seule circonstance qui, à son avis, a pu altérer sa constitution, est la grippe dont il a souffert pendant l'hiver 1894-1895, celui qui a précédé l'accident des manœuvres. Plusieurs mois durant, il eut des rhumes, de la fièvre par accès, des sueurs profuses au réveil, de l'amaigrissement à inquiéter son entourage; très énergique, il se traita par quelques doses de quinine et l'activité. De fait, rien ne restait de cette alerte, l'auscultation du cœur et des poumons était normale; l'examen viscéral le plus minutieux demeurait négatif.

Du côté de la jambe droite, voici ce qu'on observait : la face externe du mollet droit, de la tête du péroné à la malléole, de la crête tibiale à la crête péronière, offrait une série d'ulcérations d'âges divers, de dimensions différentes, mais de type uniforme; on en comptait une douzaine.

C'étaient des plaies sans croûtes, de contour régulier, rond ou ovalaire; les bords étaient plats, frangés et flottants, décollés dans une zone étroite qui offrait une couleur violacée.

Le fond de la perte de substance ne dépassait pas le derme muqueux, il était rouge granuleux dans les vieilles lésions, grisâtre dans les récentes, sans induration sous-jacente. Elles s'échelonnaient sans contact immédiat, plus pressées à la partie moyenne de la face externe du mollet où siège l'ulcération primitive, large comme une pièce de cinq francs, clairsemées à la périphérie, où leurs dimensions sont plus petites, de 1 à 2 centimètres de diamètre.

Les intervalles de peau intacte laissés entre elles offrent une teinte saumonée, fondue avec la zone violacée des bords décollés.

Cette peau est souple, élastique, sans infiltration œdémateuse ou scléreuse; mais par place, à la périphérie, on trouve dans son épaisseur ou au-dessous d'elle des nodosités du volume d'un pois, qui sont, au dire du malade, l'amorce de futures ulcérations.

Elles n'aboutissent pas toutes, les unes se flétrissent sans s'ouvrir, les autres évoluent sans qu'il soit possible de prévoir leur destinée; et cepen-

dant, il lui a semblé que les indurations les plus rapprochées des ulcères sont celles qui se transforment en plaies nouvelles.

Nous constatons deux petites gommes semblables à la région supra-malléolaire, trois autres à la partie condylienne extérieure de la cuisse ; les premières évolueront par la suite comme nous l'indique l'observation du sujet, les secondes se résorberont en laissant une rétraction dermique passagère.

Dans toute la région lésée, il n'y a pas trace d'inflammation, c'est-à-dire de réaction locale ; pas de rougeur œdémateuse, pas de traînée lymphangitique, ni d'engorgement ganglionnaire. La sécrétion des plaies est peu abondante, c'est une sérosité louche, filante et gommeuse.

Point de varices apparentes ; l'exploration des diverses sensibilités nerveuses affirme leur intégrité.

La jambe et les plaies sont soigneusement débarrassées, pendant trois jours consécutifs, de toutes traces de substances antiseptiques : à cet effet, on use d'eau stérilisée en lavages et pansements humides. Alors seulement on entreprend les recherches bactériologiques : on ensemence la sécrétion des plaies en divers milieux et on l'inocule aux animaux.

Mais terminons l'étude clinique avant de donner ces résultats.

Quarante-cinq jours de repos absolu au lit, des pansements rares à l'iodoforme et, lorsque les bords et le fond des ulcérations demeuraient atones, quelques attouchements à la mixture de Lanfranc suffirent à amener une cicatrisation complète.

Protégé par le port d'un bas élastique, notre officier put reprendre sa carrière et depuis lors la guérison ne s'est pas démentie. Il a eu deux autres enfants, affectés comme les trois aînés de « croûtes de lait » tenaces, mais n'ayant, ni les uns ni les autres, de stigmates d'hérédo-syphilis.

Revu cinq ans après — février 1902 — le membre offre l'aspect suivant : sur un fond fauve clair, des taches blanches, luisantes, cerclées d'un liseré ardoisé, révèlent les anciennes ulcérations de la partie externe du mollet : le derme est souple, résistant, l'épiderme squameux et fendillé ; en somme, la guérison paraît complète et définitive.

Je donne ici la liste des antiseptiques qui, au cours de ce long traitement d'une année, furent appliqués, en pansements secs ou humides, sur les ulcérations, le professeur Charrin ayant émis l'idée que peut-être l'introduction dans les gommes ulcérées de quantités notables de divers antiseptiques est la cause de la création de la race spéciale, de même qu'il a vu autrefois, avec le professeur Guignard, que le mélange des antiseptiques au bouillon permettait de modifier les formes et les fonctions du microbe. Ce sont : aristol, iodoforme, salol, calomel, sous-nitrate de bismuth, charbon, acides phénique et borique, sublimé en solutions aux titres usuels, emplâtres de Vigo et de diachylon simple.

***

L'étude bactériologique a été faite en collaboration avec M. le Dr Troussaint, médecin-major.

Le résultat des ensemencements des produits de sécrétion dans tous les milieux usités a été le développement d'un bacille unique à l'état de pureté, dont la culture montrait, dès le second jour, la fonction chromogène carac-

téristique : coloration rouge acajou qui vire en deux ou trois jours au noir encre de Chine.

L'inoculation des produits de sécrétion, dilués dans de l'eau distillée, sous la peau et dans le péritoine de deux cobayes, ne provoque aucun trouble de la santé chez ces animaux; trois mois après, ils sont sacrifiés et trouvés sains.

L'inoculation des produits de culture aux lapins a constamment déterminé une infection généralisée, plus ou moins rapidement mortelle suivant la dose et la porte d'entrée.

La diarrhée avec hypothermie progressive était l'expression habituelle de l'infection chronique, les formes aiguës étant plus variées comme symptômes. Dans les deux cas, on avait le type de l'infection générale avec présence du bacille pathogène dans le sang, les exsudats, les organes lésés. L'activité des produits augmentait avec les passages, et nous en étions arrivés à un virus d'une activité telle qu'un demi-centimètre cube de culture de cinq jours en bouillon peptoné glycériné, déposé dans la veine auriculaire d'un fort lapin, tuait l'animal en trois jours avec exsudats hémorragiques, congestions viscérales multiples. Les produits microbiens stérilisés par la chaleur, ébullition à 100° pendant une heure, déterminaient les intoxications lentes avec diarrhée, amaigrissement extrême et hypothermie, identiques aux infections chroniques.

Chez le cobaye, il fut impossible de déterminer des accidents mortels : il se formait toujours au point d'inoculation un foyer caséeux dont l'ouverture se cicatrisait rapidement.

Tous ces caractères rapprochaient ce microbe du bacille pyocyanique mais il était toujours impossible d'obtenir la production caractéristique de pyocyanine. C'est alors que, par l'intermédiaire du professeur Charrin, le microbe fut confié à M. Radais, qui l'identifia définitivement comme bacille pyocyanique d'une variété nouvelle. (*Soc. de Biologie*, 24 juillet 1897.)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES PROPRIÉTÉS ET DE LA NATURE DES MÉLANGES
DES TOXINES AVEC LEURS ANTITOXINES

Par J. DANYSZ.

Si la question du mécanisme de l'immunité contre les microbes pathogènes peut être considérée aujourd'hui comme définitivement résolue, il n'en est pas de même pour l'immunité antitoxique.

Les travaux de M. Metchnikoff et de ses nombreux élèves ont démontré d'une façon indiscutable que, dans l'immunité passive contre les microbes, le rôle du sérum immunisant consiste non pas dans la destruction du microbe par le sérum spécifique, mais dans le changement, par l'intermédiaire de ce sérum, de la chimiotaxie négative en chimiotaxie positive qui conduit toujours à la phagocytose, c'est-à-dire à la digestion des microbes dans l'intérieur des leucocytes.

Et comme il avait été démontré, d'autre part, qu'il n'y a pas d'immunisation et de formation de sérum antimicrobien sans phagocytose, il fallait bien en conclure que c'est aussi les leucocytes qui fabriquent l'immunisine.

Il était donc tout naturel d'attribuer aux leucocytes un rôle analogue dans l'immunité antitoxique passive et active, mais, comme il n'est guère possible de suivre dans l'organisme une toxine, l'intervention des leucocytes est, dans ce cas, très difficile à mettre en évidence.

On ne sait pas ce qu'une dose immunisante de toxine devient dans l'organisme, parce que, injectées en doses immunisantes, les toxines ne produisent aucune réaction appréciable, et l'étude des lésions produites par des doses pathogènes ne peut rien nous apprendre à ce sujet, parce que rien ne nous indique qu'en doses immunisantes les toxines agissent sur les mêmes éléments et de la même façon qu'en doses pathogènes.

Il semblait que la découverte du phénomène de fixation *in vitro* de certaines toxines par certains tissus permettrait de

résoudre le problème de la production des antitoxines et du mécanisme de l'action immunisante de ces substances, mais les travaux faits dans cette direction n'ont donné jusqu'à présent que des résultats contradictoires qu'il est impossible de réunir en un ensemble simplement logique.

Ainsi, on sait, depuis Wassermann et Takaki, que la substance nerveuse broyée fixe la toxine tétanique, et que la ricine est fixée par les éléments du sang (Jacoby, Rhens) mais pendant que la toxine tétanique fixée est inactive pour les animaux, la ricine fixée par les hématies ou les leucocytes est tout aussi pathogène que la ricine normale libre.

Dans le premier cas, c'est la toxine qui est détruite par les leucocytes : dans l'autre, c'est la substance fixatrice ; l'intervention des leucocytes aboutirait donc, dans les deux cas, à des résultats contraires, et les deux faits pris ensemble ne peuvent nous fournir aucun renseignement positif sur la formation des antitoxines.

Ces deux faits indiquent, par contre, d'une façon indiscutable, qu'il n'est pas possible d'assimiler, avec M. Ehrlich, les substances fixatrices aux antitoxines. Les expériences qui suivent nous montreront en effet que les antitoxines proprement dites, fixées aux toxines, ne disparaissent jamais ni *in vitro* ni *in vivo* : un mélange inactif de toxine et d'antitoxine ne redevient jamais spontanément actif quand on le conserve dans un verre ou quand on l'injecte à un animal sensible, tandis que la substance qui fixe la toxine tétanique disparaît toujours *in vitro*, et que la substance fixatrice de la ricine disparaît *in vivo*.

Il est donc peu probable que des recherches continuées dans cette direction puissent jamais nous donner des renseignements utiles sur le mécanisme de l'immunisation antitoxique, d'autant plus que l'on ne connaissait encore que d'une façon bien imparfaite la nature des composés que les toxines forment avec leurs antitoxines et la nature de l'action que ces deux substances exercent l'une sur l'autre.

Avant d'entreprendre l'étude de la formation des antitoxines, il nous a donc semblé nécessaire de nous renseigner sur ce dernier point, et dans les chapitres qui suivent nous exposons les résultats des expériences entreprises dans ce but.

I

Nos expériences portent principalement sur les propriétés des mélanges de ricine et d'antiricine.

La solution de ricine dont nous nous sommes servi avait été préparée par la méthode indiquée par Gonzales Cruz [1] : trituration des graines de ricine décortiquées (R. de Zanzibar), dégraissage par le chloroforme, lavage par l'alcool absolu, ensuite séchage du produit lavé et dissolution dans l'eau physiologique. 1 c. c. de cette solution de ricine contenait environ 500 doses mortelles en 4 jours pour cobayes de 300 à 400 grammes, et 1,000 doses mortelles pour lapins.

Le sérum antiricinique avait été obtenu par l'immunisation d'une chèvre. Après une première série d'injections (de notre solution de ricine) 1 c. c. du sérum de cette chèvre neutralisait l'action de 0,5 c. c.; plus tard, après une nouvelle série d'injections, 1 c. c. et enfin 2 c. c. de notre solution de ricine, c'est-à-dire 1,000 doses mortelles pour cobayes.

Quand on mélange la ricine avec l'antiricine en proportions différentes, on remarque que le liquide se trouble toujours immédiatement et que, le plus souvent, il se forme un précipité ; mais on constate aussi que le temps de la formation de ce précipité varie beaucoup dans les différents cas. On trouve même des proportions dans lesquelles les deux substances mélangées ensemble ne donnent pas de précipité du tout.

Ainsi, en mélangeant par exemple 1 c. c. de notre solution de ricine avec 0,85 c. c. de sérum antiricinique, on obtient un précipité volumineux en 2 heures, et un liquide, surnageant sur ce précipité, parfaitement clair: tandis que le mélange de 1 c. c. de ricine avec 0,40 c. c. de sérum devient rapidement opalescent, mais ne donne qu'un dépôt à peine appréciable au bout de plusieurs jours. Pourtant, le mélange de 0,50 c. c. de ricine + 0,40 c. c. de sérum donne lui aussi, en 2 heures, un précipité volumineux qui ne se redissout pas dans un excès de ricine.

En préparant une série suffisamment étendue de ces mélanges dans lesquels les rapports entre les quantités de ricine et d'antiricine varient entre 1/100 et 100/1, on trouve toujours une proportion pour laquelle les deux substances forment le plus rapi-

1. *Annales d'hygiène publique et de médecine légale*, 1898.

dement le précipité le plus volumineux et, des deux côtés de cet *optimum*, deux séries de mélanges dans lesquels les temps de la formation des précipités n'augmentent pas régulièrement, mais par zones qui se suivent d'une façon très irrégulière.

Ainsi, par exemple, après une zone où les temps de la formation d'un dépôt augmentent assez régulièrement de 2 à 24 heures, on trouve une zone où un dépôt très léger ne se forme qu'après 8 jours, et ensuite encore une zone où un dépôt plus volumineux que dans la zone précédente se forme déjà au bout de 48 heures.

Nous ne pouvons pas nous attarder à ces irrégularités qu'il ne nous est guère possible d'expliquer pour le moment : nous verrons aussi plus loin quelle est l'action de ces mélanges en proportions diverses sur les animaux ; ce qu'il importe de faire ressortir ici avant tout, c'est d'abord le fait que, pour donner un précipité, la ricine et l'antiricine doivent s'imprégner ou se fixer mutuellement en proportions déterminées, et qu'il y a un *optimum* de proportions dans lesquelles les deux substances mélangées ensemble se fixent et donnent le plus rapidement le précipité le plus volumineux; et ensuite cet autre fait que, mélangées en d'autres proportions, elles ne donnent pas de précipité du tout ou un précipité relativement peu volumineux.

Tels qu'ils sont, ces deux faits nous indiquent déjà d'une façon évidente que, s'il y a pour la ricine et l'antiricine un *optimum* de fixation ou d'équilibre, ces deux substances ne se fixent pas seulement dans ces proportions *optima* pour former un composé unique, mais qu'elle peuvent se fixer en plusieurs proportions différentes, et former une série de composés dans lesquels l'une des deux substances est partiellement imprégnée par l'autre par rapport à cet *optimum*.

Si par exemple 1 c. c. de ricine + 0,85 c. c. d'antiricine donnent 100 volumes du composé le plus stable ou le mieux fixé, 1 c. c. de ricine + 0,425 c. c. de sérum ne donneront pas 50 volumes du même composé et 50 volumes de ricine libre, mais 100 volumes d'un composé dans lequel la ricine sera, par rapport au composé précédent, à moitié imprégnée par l'antiricine.

Le précipité qui se forme quand on mélange une solution de ricine avec un sérum antiricinique en *proportions optima* est certainement trop volumineux pour que l'on puisse le considérer

comme exclusivement constitué par la ricine et l'antiricine contenues dans les liquides, ainsi que l'a déjà fait justement remarquer M. Jacoby[1].

Pourtant, un sérum qui ne contient pas d'antiricine ne précipite pas par la ricine, et le précipité qui se forme dans un mélange en *proportions optima* contient toute la ricine et l'antiricine qui se trouvaient dans le liquide. Il est donc certain que si le précipité contient d'autres substances en dehors de la ricine et de l'antiricine, sa formation est une fonction exclusive de ces deux substances.

II

Quand on essaie l'action du mélange de ricine et d'antiricine en *proportions optima* sur les animaux, on constate qu'il est inoffensif pour les lapins et pour les cobayes, mais on constate aussi qu'il n'est pas complètement neutre.

Au mélange de 1 c. c. de ricine + 0,85 c. c. de sérum, on peut encore ajouter 0,01 c. c. de ricine sans le rendre pathogène pour le cobaye, et il faut y ajouter à peu près 0,2 c. c. de ricine (100 d. m.) pour tuer le cobaye en 4 jours. Injecté préventivement, il préserve le cobaye contre 5 doses mortelles environ.

Un tel mélange est donc nettement antitoxique pour le cobaye, il l'est un peu moins pour le lapin, animal plus sensible à l'action de la ricine que le cobaye.

En cherchant à réaliser un mélange complètement inactif, on arrive toujours à reconnaître qu'un tel mélange n'existe pas. — Ainsi, 1 c. c. de ricine + 0, 70 c. c. de sérum tue le cobaye en 12 jours, et le même mélange additionné d'une dose mortelle en 4 jours ne tue qu'en 8 jours.

1 c. c. de ricine + 0,75 c. c. de sérum produit chez le cobaye un gros œdème suivi d'une induration persistante, sans le tuer, et ce même mélange additionné d'une dose mortelle est seulement un peu plus pathogène, mais ne tue pas non plus; enfin, le mélange de 1 c. c. de ricine + 0,80 c. c. de sérum n'est plus pathogène du tout, mais il est plus antitoxique que les deux mélanges précédents.

Les deux premiers mélanges sont à la fois toxiques et anti-

1. *Beitraege zur Chem. Physiol. u. Pathol.* Band I, Heft 1/2.

toxiques; le dernier n'est plus toxique, mais il est encore antitoxique, on ne peut donc pas l'appeler *neutre*, mais simplement *minimum actif*.

Pour obtenir un mélange minimum actif pour le lapin, plus sensible que le cobaye, il faut ajouter à 1 c. c. de ricine 0,84 c. c. de sérum. Le mélange *minimum actif* de ricine et d'antiricine est donc différent pour chaque espèce d'animaux de sensibilité différente et même pour les différents individu de la même espèce, ainsi que cela avait été constaté par M. Roux et M. Vaillard pour les mélanges de toxine et d'antitoxine diphtérique et tétanique.

Ceci dit pour caractériser les propriétés des mélanges que jusqu'à présent on a appelés bien à tort *neutres* ou *inactifs*, nous pouvons examiner maintenant la nature des composés que les toxines forment avec les antitoxines.

III

Un mélange minimum actif une fois établi pour un animal quelconque ne redevient jamais spontanément pathogène. Le chauffage de plusieurs jours à 37°, ou à 45° en solutions concentrées, ou diluées dans l'eau distillée, ou dans l'eau physiologique (à 7 0/00), ne le modifie pas sensiblement.

On peut le rendre légèrement pathogène en le traitant par l'eau salée à 10 0/0.

Exp. 1. — Après avoir établi qu'un volume de notre sérum antiricinique (sérum de chèvre) donne un mélange minimum actif pour lapins avec 2 volumes de notre solution de ricine, dont 0,001 c. c. tue le lapin en 3 à 4 jours, on mélange ensemble 1 c. c. de sérum et 2 c. c. de ricine, et on laisse le mélange en repos pendant 24 heures.

Il s'est formé un précipité très abondant. On émulsionne ce précipité. et on en prélève une moitié que l'on injecte ou lapin 1770. Le lapin maigrit d'abord un peu, sans présenter aucune réaction appréciable au point de l'inoculation, et revient bientôt à son poids normal.

L'autre moitié est centrifugée. On décante le liquide que l'on remplace par 3.5 c. c. d'eau salée à 10 0/0. et on laisse macérer pendant 6 jours à la température du laboratoire. Alors on centrifuge de nouveau et on injecte séparément le liquide et le dépôt.

Le dépôt tue le lapin 1750 en 4 jours.

Le liquide tue le lapin 2000 en 8 jours.

Les deux animaux présentent à l'autopsie les lésions caractéristiques de l'intoxication par la ricine.

Le mélange, qui contenait 1,000 doses mortelles de ricine pour lapins, agit donc après une macération de 6 jours dans l'eau salée à 10 0/0 à peu près comme 1 dose de ricine libre.

Il ne peut certainement être question d'une destruction de l'antitoxine par l'eau salée ou par la ricine en présence de l'eau salée, mais très probablement d'une redissolution par l'eau salée d'un peu de globuline qui avait été entraînée par le précipité et qui, à son tour, a pu fixer et entraîner un peu de ricine.

La ricine fixée par l'antiricine ne devient donc jamais spontanément libre. Pour la mettre en liberté, il faut détruire l'antiricine par une substance qui n'attaque pas la ricine.

Le fait que la ricine tue certains animaux par ingestion nous a donné l'idée de soumettre à l'action du suc gastrique la ricine, l'antiricine et un mélange minimum actif de ricine et d'antiricine.

Le mélange de 0,5 c. c. de sérum donne avec 1 c. c. d'une solution de ricine dont 0,005 c. c. tue le cobaye en 4 jours, un composé minimum actif pour cobaye.

On traite séparément, par 1 c. c. de suc gastrique frais : 1 c. c. de ricine; 0,5 c. c. de sérum antiricinique préalablement chauffé pendant 1 heure à 55°, et 1,5 c. c. d'un mélange de 1 c. c. de ricine avec 0,5 de sérum dans de l'eau physiologique acidifiée à 1/10 d'acide chlorhydrique normal. Le volume de tous les liquides est porté à 10 c. c.

On laisse digérer pendant 16 heures à 45°, on neutralise exactement par la soude, et on essaie les liquides *in vitro* sur les hématies de cobaye et *in vivo* sur les cobayes.

Exp. 2 A. — *Action des liquides traités par le suc gastrique sur les hématies de cobaye.*

DOSES de ricine.	AGGLUTINATION APRÈS 24 HEURES, ÉVALUÉE COMPARATIVEMENT				
	RICINE normale.	RICINE traitée par le suc gastrique.	SÉRUM traité par le suc gastr. + ricine normale.	MÉLANGE traité par le suc gastr.	MÉLANGE normal.
0.01 c. c...	aggl. évaluée à 5 0/0	0	1 0/0	0	
0.02 —	— 20 0/0	0	5 0/0	0	
0.03 —	— 80 0/0	0.	10 0/0	0	
0.04 —	— 95 0/0	0	20 0/0	0	inactif à toutes les doses.
0.05 —	— 100 0/0	0	50 0/0	0	
0.07 —	— —	0	—	0	
0.10 —	— —	2 0/0	100 0/0	0	
1 c. c......	— —	95 0/0	—	50 0/0	

Exp. 2 B. — *Action des liquides traités par le suc gastrique sur le cobaye.*

DOSES de ricine.	RICINE normale.	RICINE traitée par le suc gastrique.	SÉRUM (0.05 c. c.) traité par le suc gastrique + ricine normale.	MÉLANGE traité par le suc gastrique.	MÉLANGE normal.
0.005 c. c.	Cob. 390 + 4 j.	—	—	—	—
0.01 —	Cob. 410 + 2 j.	Cob. 370 0	Cob. 400 + 4 j.	Cob. 280 0	—
0.02 —	—	— 440 0	— 330	— 290 ...	—
0.03 —	—	— 390 —	— — + 36 h.	— 280 ≡	—
0.05 —	—	— 400 =	— 400	— 400 ≡	—
0.10 —	—	— 410 + 10 j.	— 410 + 16 h.	— 350 + 5 j.	—
0.5 —	—	— 420 + 3 j.	—	— 400 + 24 h.	pas de réaction.

Ces deux expériences montrent nettement que le suc gastrique diminue beaucoup l'activité pathogène de la ricine et qu'il détruit complètement l'antiricine. On constate aussi que les résultats de l'expérience *in vitro* et *in vivo* ne concordent pas exactement : ainsi la puissance agglutinante de la ricine traitée par le suc gastrique est plus grande que celle du mélange de ricine et d'antiricine traité de la même façon, tandis qu'au contraire, *in vivo*, le mélange est relativement plus actif que la ricine seule.

Il y a donc probablement une fixation secondaire de la ricine par les produits de la digestion du sérum, produits qui restent insolubles dans l'eau physiologique et retiennent la ricine en présence des globules rouges, mais qui, injectés à un animal vivant, doivent être solubilisés dans l'organisme et laissent alors échapper la ricine qu'ils retenaient.

L'acide chlorhydrique seul, employé à la dose de 1/10 n.

par c. c. de liquide, détruit à peu près exactement autant de ricine que d'antiricine.

Ainsi, la ricine, le sérum antiricinique et un mélange minima actif soumis à l'action de l'acide chlorhydrique 1/10 n. pendant 16 heures à 45° ont donné à l'essai les résultats suivants :

Expérience 3.

DOSES de ricine.	RICINE traitée par l'acide chlorh.	SÉRUM traité par l'acide chlorhydr. + ricine normale.	MÉLANGE traité par l'acide chlorhydr.
0.01 c. c.......	Cobaye 370 0	Cobaye 400 0	inactif à toutes les doses.
0.02 —	— 350 =	— 420 ...	
0.05 —	— 380 + en 10 j.	— 400 =	
0.10 —	—	— 410 + en 3 j.	

En présence de ces faits, il était encore intéressant de voir si un mélange non pathogène par injection sous la peau pouvait tuer l'animal par ingestion.

Nous avons donc introduit, à l'aide d'une sonde molle pour ne pas perforer l'estomac, d'une part :

Chez 4 cobayes, 2 c. c. de ricine pure par animal. De ces 4 cobayes, 2 ont survécu sans aucune réaction, les 2 autres sont morts après 10 et 15 jours.

D'autre part, chez 4 cobayes, 2 c. c. par tète d'un mélange minimum actif : les 4 cobayes ont succombé en 8 à 15 jours.

On peut encore rendre fortement pathogène un mélange inoffensif de ricine et d'antiricine, en le soumettant à l'action prolongée du suc pancréatique, à 45°.

L'action de suc pancréatique sur l'antiricine n'est ni aussi prononcée ni de la même nature que celle du suc gastrique acide.

In vitro, un mélange minimum actif ne devient jamais actif après macération dans le suc pancréatique, tandis que le même mélange traité par le suc gastrique agglutine énergiquement les hématies : *in vivo*, l'action de la ricine qui pourrait redevenir libre est difficilement dosable parce que le suc pancréatique lui-même n'est pas inoffensif pour les petits animaux.

Exp. 4. — Lapin 1760 reçoit un c. c. d'un mélange minimum actif contenant 100 doses mortelles pour lapin, après traitement par le suc pancréatique.

Il meurt en 2 jours. Petit œdème au point d'inoculation, congestion intestinale assez caractéristique de l'intoxication par la ricine.

Lapin 1850, reçoit la même dose d'une solution de suc pancréatique. Mort en 10 jours.

Cette première série d'expériences, qui avaient pour but de préciser nos connaissances sur l'action réciproque des toxines et des antitoxines, nous ont donc permis de constater qu'un mélange de ricine et d'antiricine, non pathogène et ne contenant pas d'antiricine libre, ne devient jamais spontanément ni plus toxique ni plus antitoxique, et que ces deux substances accolées l'une à l'autre gardent leurs propriétés spécifiques. On peut toujours, dans un tel mélange, retrouver la ricine en détruisant l'antiricine par une diastase protéolytique, et prouver l'existence de l'antiricine par les propriétés immunisantes du mélange que nous examinerons dans le chapitre suivant.

Ces expériences confirment donc l'idée généralement admise aujourd'hui que, *in vitro*, les toxines et les antitoxines ne possèdent aucune action diastasique les unes pour les autres.

IV

Pour une solution de ricine dont 0,005 c. c. tue le cobaye en 3 à 4 jours et un sérum antiricinique (sérum de chèvre) dont 0,1 c. c. donnait avec 0,15 c. c. de notre solution de ricine un mélange minimum actif pour cobayes, nous avons trouvé les constantes d'Ehrlich comme suit :

Exp. 5. — Dose mortelle de ricine = 0,005 c. c.

Mélange minimum actif : 0,1 c. c. de sérum + 0,15 c. c. de ricine = 30 doses mortelles.

Mélange mortel en 4 jours : 0,1 c. c. de sérum + 0,40 c. c. de ricine = 80 doses mortelles.

Différence 0,25 c. c. de ricine = 50 doses mortelles.

Le phénomène d'Ehrlich est donc dans ce cas très prononcé, mais pour obtenir la différence de 50 doses mortelles entre le mélange inactif et le mélange mortel, il est absolument nécessaire d'ajouter au sérum les doses croissantes de ricine en entier, en une seule fois. Il suffit de changer la façon de préparer les mélanges, de préparer d'abord une série de mélanges inactifs, d'ajouter 24 heures après les excès de ricine, et d'injecter ces

mélanges après encore 24 heures de repos, pour abaisser cette différence de 50 à 10 doses mortelles.

Avec la même solution de ricine, et un sérum un peu plus faible nous avons obtenu dans les deux cas les constantes suivantes :

Expérience 6.

Série A. Les doses de ricine sont ajoutées en une seule fois.	1 jour.	2 jours.	3 jours.	4 jours.	*Série B*. Les excès de ricine sont ajoutés au mélange inact. ap. 24 h. Les mélanges sont injectés aussi après 24 h.	1 jour.	2 jours.	3 jours.	4 jours.
0.2 c c. sérum + 0.14 c. c. ricine Cob. 220	pas de réaction.								
— + 0.16 — — 230	—	—	—	—	+ 0.02 c. c. ricine. Cob. 220	—	=	≡	+
— + 0.18 — — 250	—	=	=	=	+ 0.04 — — 220	—	=	+	
— + 0.20 — — 250	—	=	≡	≡	+ 0.06 — — 230		+		
— + 0.22 — — 270	—	=	≡	≡	+ 0.08 — — 270	+			
— + 0.24 — — 300	—	—	=	+	+ 0.10 — — 330	+			
Différence : 20 doses mort.					Différence : 4 doses mort.				

L'expérience *in vitro* sur les hématies de lapin ou de cobaye donne des résultats encore plus nets et plus faciles à apprécier.

En faisant agir notre solution de ricine sur 0,5 c. c. d'hématies de lapins lavées, en suspension dans 5 c. c. d'eau physiologique, on constate que la première réaction appréciable (une agglutination de 5 0/0 environ de toutes les hématies) est obtenue par la dose de 0,01 c. c. de ricine, et l'agglutination complète de toutes les hématies en une seule masse par la dose de 0,6 c. c. de ricine.

Nous avons un sérum antiricinique dont 0,2 c. c. neutralisent l'action de 0,1 c. c. de ricine.

En faisant agir, dans les conditions indiquées, sur les hématies de lapin les mélanges qui suivent, on obtient l'agglutination complète par le mélange n° 6.

Expérience 7 A.

		on obtient :
1.	0.2 ar. + 0.1 r.	pas de réaction.
2.	— + 0.12 —	agglutination croissante, de 2 0/0 à 10 0/0.
3.	— + 0.18 —	
4.	— + 0.20 —	
5.	— + 0.22 —	
6.	— + 0.24 —	agglutination de 99 0/0.
7.	— + 0.26 —	agglutination croissante, de 90 0/0 à 100 0/0.
8.	— + 0.28 —	
9.	— + 0.30 —	
10.	— + 0.35 —	
11.	— + 0.40 —	

Tandis qu'en ajoutant les excès de ricine aux mélanges

minimum actifs préparés 24 heures d'avance, on obtient le même résultat dans le mélange n° 3.

Expérience 7 B.

1.	(0.2 ar. + 0.1 r.)		on obtient :	pas de réaction.
2.	(0.2 ar. + 0.1 r.)	+ 0.02 r.	agglutination :	2 0/0
3.	—	+ 0.08 —		99 0/0
4.	—	+ 0.10 —		99 à 100 0/0.
5.	—	+ 0.12 —		
6.	—	+ 0.14 —		
7.	—	+ 0.16 —		
8.	—	+ 0.18 —		
9.	—	+ 0.20 —		
10.	—	+ 0.25 —		
11.	—	+ 0.30 —		

Il est à noter pourtant que ce résultat n'est obtenu qu'à la fin de l'expérience (après 24 heures). Dans les premières 2 à 3 heures, l'agglutination augmente (intensité et rapidité) régulièrement et proportionnellement à l'augmentation des doses de ricine ajoutées, — de sorte qu'au début de l'expérience les réactions des mélanges 1 à 5 de la série B sont plus avancées que celles de la série A., tandis qu'au contraire les réactions des mélanges 6 à 11 de la série B sont moins avancées que celles de la série A.

Dans les mélanges de la série B, l'excès de ricine ajoutée aux composés neutres est donc fixée par ces composés, mais cette fixation est moins intime et certainement d'une autre nature que celle de la série A.

Les graphiques du tableau n° 1 représentent les allures différentes de ces deux séries de réactions.

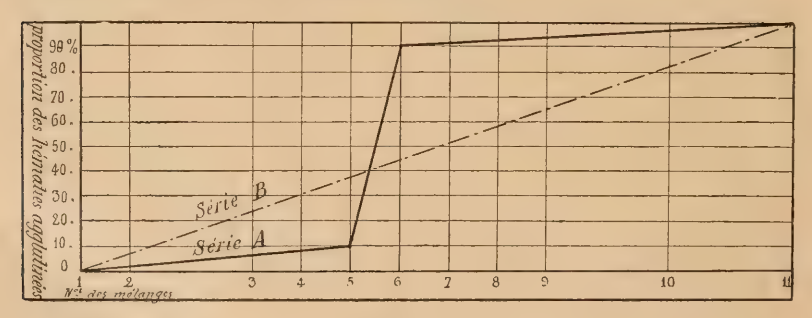
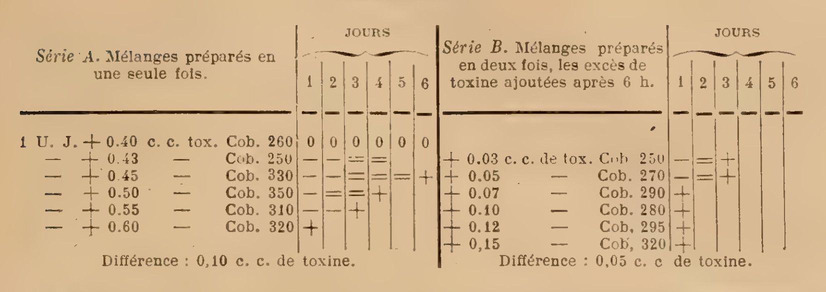


Fig. 1.

On obtient des résultats analogues avec la toxine et l'antitoxine diphtérique.

Toxine diphtérique. Dose mortelle en 3 ou 4 jours : 0,01 c. c.

Expérience 8.



Série A. Mélanges préparés en une seule fois.	Jours 1	2	3	4	5	6
1 U. J. + 0.40 c. c. tox. Cob. 260	0	0	0	0	0	0
— + 0.43 — Cob. 250	—	—	=	=		
— + 0.45 — Cob. 330	—	—	=	=	=	+
— + 0.50 — Cob. 350	—	=	=	+		
— + 0.55 — Cob. 310	—	—	+			
— + 0.60 — Cob. 320	+					

Différence : 0,10 c. c. de toxine.

Série B. Mélanges préparés en deux fois, les excès de toxine ajoutées après 6 h.	Jours 1	2	3	4	5	6
+ 0.03 c. c. de tox. Cob 250	—	=	+			
+ 0.05 — Cob. 270	—	=	+			
+ 0.07 — Cob. 290	+					
+ 0.10 — Cob. 280	+					
+ 0.12 — Cob, 295	+					
+ 0,15 — Cob, 320	+					

Différence : 0,05 c. c de toxine.

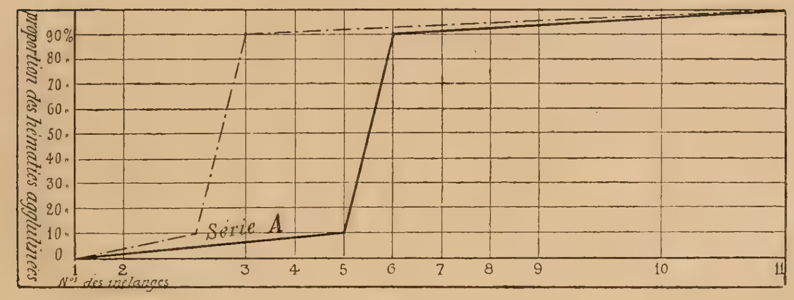


Fig. 2.

Suivant la façon dont on prépare les mélanges, on obtient donc pour la ricine un mélange mortel en ajoutant à une quantité constante d'antiricine tantôt 48, tantôt 32 doses mortelles, pour la toxine diphtérique, tantôt 50, tantôt 43 doses mortelles.

On constate en outre qu'un mélange non pathogène et ne contenant pas d'antitoxine libre est malgré cela antitoxique : pour la ricine, sur 28 doses mortelles, il fixe encore 4 doses mortelles ; pour la diphtérie, il fixe 3 doses mortelles sur 40.

Un tel mélange injecté préventivement est aussi nettement antitoxique.

Expérience 9.

Diphtérie. Inj. du mél. inactif et 24 h. après 1 dose mort. : léger œdème.
— — — 2 — : + en 5 jours.
— — — 5 — : + en 2 jours.

Pour répondre à l'objection possible que les mélanges inoffensifs que nous avons employés pouvaient contenir un peu d'antitoxine libre, nous avons injecté à une série de cobayes d'abord

des mélanges nettement pathogènes et, 24 heures, après de la toxine libre, et nous avons constaté :

EXPÉRIENCE 10.

Ricine. Mélange pathogène............. : fort œdème, nécrose survie.
— — et 24 h. après 1 dose mort. : + en 10 jours.
— — — 2 doses mort. : + en 5 jours.
Tétanos. 1 dose mortelle tue en 3 à 4 jours.

EXPÉRIENCE 11.

Mélange légèrement pathogène et 24 h. après 1 dose mort. : + en 7 jours.
— fortement pathogène — 1 — : + en 7 —
— mortel en 6 jours — 1 — : + en 5 —

Les résultats des expériences 5 et 6 nous ont donné à penser qu'en ajoutant la ricine à l'antiricine en doses encore plus fractionnées, on obtiendrait un mélange pathogène avec des quantités de ces deux substances qui, mélangées ensemble en une seule fois, donnent toujours un composé inoffensif.

EXP. 12. — Et en effet, le mélange de 0,4 c. c. de sérum et de 0,6 c. c. de ricine préparé en une seule fois et injecté au cobaye 260 ne donne aucune réaction appréciable, l'animal se porte bien et augmente de poids, tandis que le mélange de 0,4 c. c. de sérum + 4 fois 0,15 c. c. de ricine ajoutées au sérum en 4 doses avec des intervalles de 10 à 24 heures et un repos de 24 heures après l'addition de la dernière dose, injecté au cobaye 250, le fait maigrir beaucoup et le tue en 20 jours.

Le mélange de 0,4 c. c. de sérum + 3 fois 0,15 c. c. + 0,10 c. c. de ricine, n'est pas encore inoffensif.

Le mélange complètement inoffensif serait à peu près de 0,4 c. c. de sérum + 3 fois 0,15 c. c. + 0,05 c. c. donc, en tout, 0,5 c. c. de ricine.

Le mélange inoffensif est donc tantôt de : 0,4 c. c., de sérum, + 0,6 c. c. de ricine = 120 doses mortelles ; tantôt de 0,4 c. c. de sérum + 0,50 c. c. de ricine = 100 doses mortelles.

On obtient des résultats analogues en ajoutant à la ricine de l'antiricine en doses fractionnées ; ainsi, si 10 d'antiricine ajoutées à 15 de ricine en une seule fois donnent un mélange minimum actif pour cobaye, on obtiendra un composé jouissant à peu près des mêmes propriétés pour le cobaye avec 8 d'antiricine + 15 de ricine, à la seule condition d'ajouter l'antiricine par 2 10, en 4 doses successives ; on peut donc en conclure que les

deux substances peuvent se fixer réciproquement de la même façon et en proportions variables.

De l'ensemble de nos expériences nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° La formation des précipités dans les mélanges en proportions différentes de ricine et d'antiricine, ainsi que les propriétés variables des mélanges contenant des quantités identiques de toxine et d'antitoxine, et enfin les propriétés à la fois antitoxiques et toxo-actifs des composés des toxines et des antitoxines mélangées en proportions quelconques, prouvent d'une façon incontestable que ces deux substances se fixent ou s'imprègnent réciproquement en proportions variables. Mélangées ensemble, les toxines et les antitoxines ne forment donc pas un composé unique, mais une série de composés dans lesquels l'une des deux substances est plus ou moins imprégnée par l'autre, et qui sont par conséquent plus ou moins actifs;

2° Les antitoxines se fixent *in vitro* sur les toxines et en saturent plus ou moins les affinités sans les détruire, leur action sur les toxines est donc exactement de la même nature que celle des immunisines sur les microbes.

RECHERCHES SUR LES MODES D'UTILISATION
DU CARBONE TERNAIRE
PAR LES VÉGÉTAUX ET LES MICROBES

PAR P. MAZÉ

DEUXIÈME MÉMOIRE

Les conclusions exposées dans le développement du premier mémoire (ces *Annales*, mars 1902) ne présentent pas la netteté à laquelle il faut viser dans les questions de l'ordre de celles qui font l'objet de ce travail.

Ce défaut est inhérent, comme je l'ai fait observer plusieurs fois, à la nature même des matériaux sur lesquels ont porté mes investigations. C'est qu'à côté des aliments ternaires, il y a toujours des substances albuminoïdes dont les modifications marchent de pair avec celles que subissent les premiers.

En présence de l'air, il est probable que les matières azotées absorbent de l'oxygène et dégagent de l'acide carbonique, dans le cours de transformations qui préparent leur incorporation à la substance vivante; mais on ne sait rien sur la valeur des échanges gazeux qui peuvent être attribués à ce travail, et on ignore complètement quelle est la grandeur de la portion de la molécule albuminoïde alimentaire qui entre définitivement dans la constitution du cytoplasme et du noyau.

Ainsi, il est impossible de démêler, même d'une façon approximative, la part qui revient aux matières ternaires et celle qu'il faut attribuer aux matières azotées dans la production du CO^2 qui se dégage au cours du processus d'assimilation. C'est pour cela que, dans l'estimation de l'acide carbonique éliminé par les cotylédons d'arachide, tableau XIV, 1er mémoire, je n'ai considéré que la moitié seulement comme résultant du dédoublement ou de la combustion du sucre, certain de cette façon de ne pas exagérer les faits en faveur du résultat à atteindre.

Si l'analyse des phénomènes manque déjà de précision dès l'origine des transformations premières qui s'effectuent dans les aliments, à plus forte raison faut-il abandonner tout espoir de suivre les manifestations extérieures des travaux de synthèse et d'analyse qui s'opèrent continuellement dans la substance vivante déjà formée.

Puisque le carbone quaternaire est si encombrant, il suffit de se placer dans des conditions qui permettent de l'éliminer; les mucédinées vont nous en fournir les moyens. Mais avant d'aborder cette question, je dois dire qu'il était cependant utile de suivre chez les végétaux supérieurs les transformations des aliments ternaires aussi loin que le permettent les notions acquises dans l'état actuel de la science; et il était surtout intéressant d'établir les relations de la vie végétative et de la vie fermentative, de montrer qu'en somme celle-ci n'est qu'un tronçon de celle-là.

On devine aisément l'importance de cette notion. Puisqu'un végétal comme le pois est capable de transformer les sucres fermentescibles, dans la vie anaérobie, exactement comme la levure, et que leur dédoublement en alcool et acide carbonique est une transformation normale accomplie en vue de l'incorporation à la substance vivante de la fraction utilisable de la molécule de sucre, on est tout de suite conduit à se demander si les phénomènes de fermentation en général ne doivent pas présenter ce caractère physiologique, au lieu d'être une manifestation anormale de la vie gênée, comme le veut l'opinion courante.

Les faits établis pour le pois se résument dans les deux propositions suivantes :

Les semences de pois, privées d'oxygène, dédoublent les sucres fermentescibles en alcool et acide carbonique, mais ils ne construisent pas de substances vivantes.

Placées dans les conditions favorables, elles exercent la même action sur les sucres, et utilisent l'alcool à la construction de la plantule.

Ces conclusions ne s'appliquent pas intégralement à la levure; mais c'est parce qu'on n'a pas pu les établir par l'expérience, et non parce qu'elles ne correspondent pas à la réalité des faits.

Par contre, elles s'appliquent à la lettre à un *ascomycète*

l'*Eurotiopsis Gayoni*[1] qui possède, parmi un grand nombre de propriétés physiologiques très curieuses, celle de faire fermenter les sucres avec la même activité que la levure, et de se développer en milieu minéral aux dépens de l'alcool, mieux, disons-le tout de suite, que si on lui offrait du dextrose.

C'est donc ce champignon qui va nous permettre de pousser, beaucoup plus loin que les végétaux supérieurs, l'étude que je poursuis, et en même temps de dégager les conclusions qui ont déjà été formulées, de ce qu'elles présentent de flottant.

A la rigueur, j'aurais pu m'adresser à d'autres champignons ; on connaît plusieurs espèces de mucors qui dédoublent activement les sucres fermentescibles en alcool et acide carbonique, et qui sont quelquefois capables de consommer l'alcool; l'aspergillus niger se nourrit également très bien d'alcool, et si les spores ne peuvent pas se développer dans le milieu Raulin, où l'alcool remplace le saccharose, il est probable qu'avec un peu d'accoutumance, elles arriveraient vite à acquérir cette faculté.

Ce qui m'a déterminé à accorder la préférence à l'eurotiopsis, c'est son haut degré de polyphagie ; il est, en outre, capable de prendre son azote aux substances azotées des plus variées, depuis l'ammoniaque et l'acide nitrique jusqu'aux matières albuminoïdes, ce que les mucédinées ne font pas toujours très volontiers. Il y aura donc là aussi un terrain tout préparé pour faire avec les matières azotées des observations analogues à celles que nous allons faire avec les substances ternaires.

II

Pour reprendre les faits au point où on les a laissés dans le mémoire précédent, il faut commencer par étudier comparativement la nutrition hydrocarbonée et l'alimentation en alcool de l'eurotiopsis Gayoni.

Ce champignon pousse très bien sur milieu Raulin; j'ai utilisé ce milieu sans apporter de modification à sa composition minérale, en mettant à profit les notions établies par M. Laborde (*loc. cit.*) dans un travail très complet sur la physiologie de l'eurotiopsis.

1. Laborde, ces *Annales*, 1897, p. 1.

Pour obtenir des résultats aussi comparables que possible, lorsqu'on fait varier la nature de l'aliment ternaire, il y a quelques précautions à prendre :

Ainsi, la profondeur du liquide influe d'une manière inégale sur le développement du champignon, lorsqu'on lui offre des aliments différents. En milieu sucré, il émerge assez vite du liquide ; en milieu alcoolisé, il met un temps bien plus long, à égalité d'épaisseur, pour parvenir à la surface; cela tient non pas à une infériorité de l'aliment alcoolique, mais à une production plus abondante d'acide carbonique aux dépens du sucre, qui, en se transformant en alcool, donne naissance à une certaine quantité de gaz qui ne se forme pas lorsqu'on fournit directement de l'alcool. Le mycélium gonflé de bulles imperceptibles d'acide carbonique flotte dans le liquide et arrive facilement à la surface, condition nécessaire pour obtenir un développement rapide.

Lorsqu'on remplace le sucre par l'alcool, le mycélium reste au fond du liquide; il parvient à la surface par voie de croissance en formant une végétation arborescente semblable à celle, bien connue des bactériologistes, que produisent toutes les moisissures qui poussent accidentellement dans les bouillons de culture; mais, dans ces conditions, le mycélium met un temps considérable à atteindre la surface, si l'épaisseur de la couche liquide atteint 4 à 5 c. c. ; il construit peu de substance vivante tout en consommant beaucoup d'aliments pour son entretien. Il y a donc là un inconvénient qu'il faut éviter; on y arrive en faisant des cultures sur des milieux de quelques millimètres de profondeur seulement.

Quand le mycélium a atteint la surface, il se développe avec une rapidité comparable à celle de l'aspergillus niger, de sorte qu'au bout de 2 ou 3 trois jours, le voile atteint une épaisseur telle que les conditions d'existence des portions inférieures deviennent difficiles; elles manquent d'oxygène; il faut donc mettre fin aux expériences avant que le végétal ne se soit créé à lui-même des conditions de milieu trop différentes de celles qu'il avait au début.

Cet inconvénient n'existe pas pour l'alcool, car la nécessité de réduire l'épaisseur de la couche liquide fait que la quantité d'aliment ternaire que l'on peut introduire dans une culture est insuffisante pour permettre la formation d'un voile trop épais.

Cette obligation entraîne la nécessité de choisir des récipients à fond parfaitement plan; s'il est inégal, le mycélium émerge plus vite dans les régions les moins profondes; la culture y sera relativement plus âgée; elle aura consommé plus longtemps sans produire une augmentation correspondante de poids de végétal, car l'épaisseur du voile n'est pas proportionnelle au temps; on pourra donc obtenir des cultures, dans des récipients à fond irrégulier, d'un poids inférieur à celles qui se seront développées en voile régulier, et qui cependant auront quelquefois consommé une quantité d'aliments moins élevée que les premières.

On trouvera quelques contradictions de cette nature dans le cours de ce travail; c'est à cette cause qu'il faudra les rapporter; je n'ai pas pu les éviter parce qu'il est difficile de se procurer des fioles coniques tubulées semblables à celles qui m'ont déjà servi pour l'étude des végétaux supérieurs (1er mémoire, p. 211) dont le fond soit parfaitement plan.

Les spores, suivant leur âge, mettent un temps plus ou moins long à germer; il y a donc, au début des cultures, un temps mort qui précède le développement et qui présente une durée variable; ce détail n'offre aucun inconvénient si l'on ne considère que le poids de substance vivante et la quantité d'aliment qu'elle a détruit; mais il n'en va pas de même si l'on introduit dans l'interprétation des résultats la notion de temps. Pour tourner la difficulté, on prenait les spores sur des cultures en voie de développement; on les faisait germer préalablement et on vérifiait l'état de la germination par un examen microscopique, avant de s'en servir comme semence; de cette façon, la culture partait sûrement sans subir de temps d'arrêt; sa durée était donc nettement déterminée.

Je dois dire enfin que la culture originelle que j'ai utilisée sortait de la collection de l'Institut Pasteur, où elle avait été conservée sur des milieux différents du liquide Raulin; elle poussait bien sur milieu sucré, mais très mal sur un milieu alcoolisé. Pour obtenir sur ce dernier un développement rapide, j'ai été obligé de l'accoutumer pendant plusieurs mois à l'alcool; les progrès de l'accoutumance se font encore sentir dans les résultats de mes expériences, et l'évolution a été telle qu'en ce moment l'augmentation de poids dans l'unité de temps, une

fois le voile bien formé, est plus élevée, dans le cas d'alimentation en alcool que dans la nutrition hydrocarbonée.

Ces observations faites une fois pour toutes, on peut passer en revue les résultats des expériences.

Le volume de liquide Raulin ordinaire, renfermant 5 0/0 de saccharose, employé pour chaque culture, était de 50 c. c.; la stérilisation de la liqueur à la température de 100° pendant un quart d'heure, provoquait l'inversion à peu près complète du saccharose, grâce à la présence de l'acide tartrique libre. La semence apportait 1 c. c. de liquide, si bien que la quantité de sucre fourni par culture était légèrement supérieure à 2,5 gr. Le récipient dont je me suis servi a été déjà décrit dans le premier mémoire, ainsi que les appareils d'absorption. L'acide carbonique a été recueilli suivant le procédé également indiqué. Toutes les expériences ont été réalisées à la température de 29-30°. Chaque expérience permettait d'évaluer :

1° Le poids de végétal obtenu;

2° Le poids d'aliment consommé;

3° Le poids d'acide carbonique dégagé;

4° Le rendement exprimé par le rapport du poids du végétal au sucre consommé, calculé sur 100 de sucre.

Ces notions sont également importantes pour l'interprétation des résultats; mais celle qui doit attirer plus particulièrement l'attention, c'est l'acide carbonique dégagé; ses variations vont nous permettre de mettre en relief les relations qui existent entre les divers aliments ternaires qu'on peut offrir à l'eurotiopsis, considérés au point de vue de leur aptitude à produire de la matière vivante.

L'étude du rendement tend vers le même but; le rendement théorique fourni par le sucre ne peut pas être supérieur à 50 0/0, puisque l'alcool ne représente que la moitié du poids du sucre; il peut atteindre 56 0/0 environ si l'on fait intervenir l'azote de l'ammoniaque, si toutefois il n'y a pas de perte de matière au cours des synthèses qui aboutissent à la formation des substances albuminoïdes. Pratiquement, le rendement est bien inférieur à 50 0/0 du poids du sucre consommé, en raison des dépenses d'entretien qui viennent s'ajouter à celles qu'entraîne la construction.

Avec l'alcool, au contraire, le rendement théorique atteint 100 0/0 à peu près; 106 0/0, environ avec la participation de l'azote

ammoniacal, toujours avec la réserve de la perte possible de poids de matière.

Pratiquement, il sera aussi bien inférieur à ce chiffre; mais il doit rester de beaucoup supérieur à celui que fournit le sucre; car il n'y a pas de raison d'admettre *a priori* que les dépenses d'entretien diffèrent d'un mode d'alimentation à l'autre, le sucre et l'alcool n'ayant aucune action sur la réaction du milieu.

Voici maintenant les résultats fournis par quelques cultures faites sur milieu sucré :

TABLEAU I

Nos d'ordre.	Durée de l'expérience jours.	Sucre mgr.	Poids du végétal mgr.	Rendement.	CO^2 dégagé mgr.	CO^2 dégagé p r unité de poids et de temps.
1.	5 j. 19 h.	1957	677	34,6	1630,8	0,41
2.	5 — 17 —	1863,4 [1]	552	30,7	1358,4	0,43
3.	4 — 18 —	1341,3	437,7	32,63	938,6	0,45
4.	4 — 18 —	1319,2	431,9	32,73	936,8	0,45

Les chiffres de la dernière colonne sont très voisins les uns des autres; on remarque, en outre, que plus la culture est âgée, plus la quantité d'acide carbonique baisse, mais si faiblement qu'il est inutile d'insister sur ce fait pour le moment.

Les nombres qui expriment les valeurs des rendements sont en contradiction avec les résultats que l'on pouvait prévoir; plus la culture est âgée, plus le rendement doit baisser; c'est une loi qui ne demande pas d'explication; elle se conçoit d'elle-même; la contradiction doit être mise sur le compte de l'accoutumance de l'eurotiopsis au milieu Raulin sur lequel il n'avait pas été cultivé depuis longtemps. Les différences de cette nature n'ont fait que s'accentuer dans le cours de mes recherches; le rendement, qui est ici de 1/3 environ, va tomber, dans des expériences faites 6 mois plus tard, à 30 0/0 et au-dessous, tandis qu'entre les n° 1 et 2 d'une part, 3 et 4 d'autre part, il y a un intervalle de trois mois durant lequel l'eurotiopsis a subi une dizaine de passages sur milieu Raulin.

Le tableau II résume les résultats fournis par les cultures faites sur milieu Raulin dans lequel on a remplacé le sucre par l'alcool; comme le courant d'air entraîne une quantité sen-

1. Ce chiffre est erroné; il ne peut provenir que d'une faute de calcul que je n'ai pas pu rectifier, car le dosage du sucre par la méthode ordinaire à la liqueur de Fehling se fait très facilement dans le liquide Raulin; mais comme je l'ai fait figurer par mégarde dans la note des *C. R.*, je l'ai conservé ici afin de faire remarquer l'erreur.

sible d'alcool, on prévient les pertes par évaporation en interposant sur son trajet un double barboteur à eau distillée plongeant dans la glace fondante. Les cultures 1 et 2 ont reçu chacune 26 c. c. de liquide alcoolisé à 2, 5 0/0 environ en poids; le nº 3 en a reçu 35 c. c.; j'ai employé cette concentration parce qu'elle correspond à 5 0/0 de sucre; mais l'eurotiopsis se développe très bien en présence de 8 0/0 d'alcool, comme M. Laborde l'a montré.

TABLEAU II

Nos d'ordre.	Durée de l'expérience.	Alcool consommé mgr.	Poids du mycélium mgr.	Rendement.	CO^2 dégagé mgr.	CO^2 produit par unité de poids et de temps.
1.	9 j. 3 h.	356,3	163,8	46,01	386,9	0,26
2.	10 — 5 —	440	185,4	42,11	495,1	0,26
3.	9 —	581,3	292,1	50,25	586,2	0,22

Les chiffres de la dernière colonne sont encore ici à peu près identiques. Les relations qu'ils présentent avec les chiffres correspondants du tableau I sont celles que l'on pouvait prévoir; il faut remarquer, en effet, que la quantité d'acide carbonique dégagée est à peu près égale au poids d'alcool consommé. Or cet alcool correspond à un poids double de sucre; si donc on avait récolté, dans le même temps, le même poids de mycélium aux dépens du sucre, on aurait obtenu un poids double de CO^2, c'est-à-dire que les chiffres de la dernière colonne eussent été de même ordre de grandeur que ceux du tableau I.

Mais il n'en va pas de même du rendement; rapporté à un poids double de matière, il tombe bien au-dessous des chiffres obtenus avec le sucre. On peut mettre, du moins en apparence, ce résultat sur le compte du temps; car, je l'ai déjà dit, plus la durée de l'expérience augmente, plus le rendement baisse; mais le rendement et la quantité d'acide carbonique éliminé sont deux faits étroitement liés l'un à l'autre; plus le rendement baisse, plus la quantité de CO^2 dégagé augmente; donc, si on met l'un des résultats sur le compte du temps, l'autre doit être rapporté à la même cause, si bien que l'identification des deux modes d'alimentation que nous poursuivons en ce moment se traduit dans ces résultats par une différenciation.

Celle-ci s'accentue encore davantage si on veut la traduire par des chiffres. Considérons en effet les expériences réalisées en milieu alcoolisé; on peut admettre provisoirement que le

mycélium obtenu en partant de l'alcool et de l'ammoniaque représente, en alcool consommé, une quantité égale à son poids; la différence entre le poids total d'alcool disparu et le poids de mycélium obtenu exprime donc la quantité d'alcool qui a servi à l'entretien du végétal; or cette portion a subi à peu près complètement la combustion totale. Mettons en regard les poids d'acide carbonique calculés de cette façon et les poids fournis par l'expérience. Faisons de même pour les expériences 3 et 4, du tableau I, en admettant que c'est l'alcool correspondant au sucre consommé qui a servi à la construction et à l'entretien du poids de plante obtenu. Les résultats sont les suivants :

TABLEAU III

SUCRE				ALCOOL			
Expériences.	Poids calculé mgr.	Poids obtenu mgr.	Différences mgr.	Expériences.	Poids calculé mgr.	Poids obtenu mgr.	Différences mgr.
3.	1106,1	938,6	+ 177,5	1	367,6	386,9	— 19,3
4.	1100,5	936,8	+ 163,7	2	487,2	496,1	— 7,9
				3	553,2	586,2	— 33

Les différences, comme on le voit, sont de signe contraire; elles sont très sensibles dans le cas du sucre, faibles au contraire dans le cas de l'alcool. Il y a donc là une distinction bien nette à établir dans le mode d'action de l'eurotiopsis Gayoni sur le sucre et l'alcool; mais nous ne sommes pas encore en mesure d'en donner l'interprétation.

Cette anomalie m'a conduit à vérifier les résultats de mes expériences. J'ai fait, dans ce but, le bilan du carbone dans les cultures 3 et 4 tableau I. On a déterminé le carbone total du liquide de culture avant l'expérience par la combustion de l'extrait; on a fait la même opération sur le résidu après l'expérience; on a dosé également le carbone du mycélium. Voici les résultats de cette vérification faite sur les éléments de l'expérience 3.

Carbone du mycélium	225,1
Carbone du CO^2 dégagé	256
Carbone dans l'extrait	616,4
Total	1097,5
Carbone fourni	1094,4

Ces chiffres montrent qu'au point de vue de l'exactitude, les expériences 3 et 4 ne laissent rien à désirer; mais il y a dans

les résultats quelque chose d'inexplicable; on ne saurait s'en étonner, car on sait peu de choses sur les phénomènes de la vie protoplasmique; retenons simplement, pour le moment, cette contradiction à laquelle on ne s'attendait pas.

Les rapports de l'eurotiopsis avec l'oxygène atmosphérique peuvent servir à caractériser les deux modes d'alimentation que nous venons d'examiner, au même titre que le dégagement d'acide carbonique. Avec les notions que nous possédions, nous avons pu prévoir les divers résultats enregistrés ; il est facile d'en déduire aussi, *a priori*, que les cultures d'eurotiopsis absorberont, pour un même poids de plante fabriqué, la même quantité d'oxygène, qu'elles se développent aux dépens du sucre ou qu'elles poussent en présence d'alcool. Le dédoublement du sucre en alcool et acide carbonique est, en effet, une transformation indépendante de l'intervention de l'oxygène atmosphérique. Ce n'est qu'à partir de la formation de l'alcool qu'il y a absorption d'oxygène, et c'est pour cela qu'il n'y aura toujours qu'une même quantité d'assimilée, du moins dans les conditions indiquées. Ces résultats se traduiront dans la valeur du quotient respiratoire ; le dénominateur du rapport de l'acide carbonique à l'oxygène restant le même dans les deux cas, celui-ci sera proportionnel au numérateur. Or nous venons de constater que l'alimentation hydrocarbonée donne naissance à une quantité d'acide carbonique deux fois plus grande que l'alimentation en alcool. Cela veut dire que si la valeur du quotient respiratoire est 1 dans le premier cas, elle sera 0,5 à peu près dans le second.

Pour vérifier cette déduction, il faut faire des cultures dans une atmosphère confinée. La connaissance de la composition de l'atmosphère limitée, avant et après l'expérience, permettra de fixer la grandeur et la nature des échanges gazeux entre l'air et la plante, pendant toute la durée de la culture.

Je n'ai pas déterminé directement la composition initiale de l'air mis en contact avec les cultures; elle a été déduite de la richesse de l'atmosphère finale en azote. J'ai donc admis implicitement qu'il n'y a pas eu d'azote absorbé ou éliminé par les cultures.

J'ai fait usage de récipients de grande capacité; les cultures, en présence de l'alcool, ont été réalisées dans des fioles à fond

plat de 1 litre de capacité; mais il fallait prendre la précaution d'ensemencer légèrement, de façon à obtenir quelques îlots de mycélium isolés à la surface du liquide; un voile régulier de 15 centimètres de diamètre environ, tel que les fioles permettaient d'en obtenir, aurait absorbé, au bout de quelques heures après son apparition, tout l'oxygène disponible.

C'est ce qui se produit avec le sucre; le mycélium, si légèrement que l'on ensemence, a une tendance à se développer à la surface du liquide de façon à former un réseau complet, avant de donner naissance à des filaments aériens. Dans ces conditions, l'oxygène est absorbé si vite, qu'on n'en trouve plus de traces dès que le voile devient nettement apparent.

Pour cette raison, les cultures en milieu sucré ont été faites dans des ballons de 2 litres, à fond rond; on y introduisait seulement 50 c. c. de liquide de façon à obtenir peu de surface; on pouvait ainsi laisser la culture se développer jusqu'au 4e jour.

Mais le procédé n'est pas non plus exempt de tout reproche; l'inconvénient réside dans l'inégale épaisseur du liquide; le voile se forme d'abord à la périphérie; de plus, le mycélium, qui reste plus longtemps immergé vers le centre, produit de petites quantités d'alcool libre, dont on ne peut pas tenir compte; il y a donc un léger excès d'acide carbonique dû à une transformation dont le champignon n'a probablement pas tiré parti.

Les fioles et les ballons doivent remplir la double condition de résister au vide et de supporter la stérilisation à 120°. Ils sont fermés d'un bouchon à deux tubulures, au-dessous duquel on place un fort tampon de coton retenu par un étranglement du col.

Sur l'une des tubulures on place un tube manométrique dont la branche descendante a 1 mètre de longueur; son extrémité ouverte plonge dans un petit réservoir de mercure; celui-ci est formé par un petit tube cylindrique de 5 centimètres de hauteur, dans lequel on introduit 4 ou 5 c. c. de mercure; il porte une ouverture latérale qui permet la communication avec l'atmosphère; un bouchon à un trou laisse passage au tube manométrique qui vient plonger jusqu'au fond du tube; on a ainsi une colonne de mercure qui permet de suivre très exactement les variations de pression dues à l'absorption ou au dégagement de gaz dans l'atmosphère de l'appareil.

La deuxième tubulure porte un tube vertical, muni d'un joint en caoutchouc fermé par un obturateur ; c'est ce joint qui permettra d'adapter l'appareil à une pompe à mercure, de façon à en extraire complètement le gaz à la fin de l'expérience. Tous les joints et les bouchons sont noyés sous le mercure au moyen de manchons convenablement disposés.

Pour la mise en train des cultures, il y a quelques précautions à prendre ; les cultures sur milieu sucré dégagent plus d'acide carbonique qu'elles n'absorbent d'oxygène ; il y a donc augmentation de pression dans l'appareil ; pour prévenir les pertes de gaz provoquées par excès de pression, il faut y faire, au moyen d'une trompe, un vide de 10 à 12 c. c. de mercure.

La précaution est superflue lorsqu'on cultive le champignon sur un liquide alcoolisé ; il y a, en effet, dans ces conditions, plus d'oxygène assimilé que d'acide carbonique éliminé ; la pression baisse à l'intérieur de la fiole et le mercure monte dans le tube manométrique.

Pour recueillir les gaz des récipients de culture à la fin de l'expérience, on adapte, comme je l'ai dit, les fioles à une pompe à mercure, et on dirige les gaz dans un volumètre de 2 litres environ de capacité, exactement 19,495,5 c. c. à 15°. Quand on a obtenu une dépression convenable au-dessus des cultures, on les porte à une température de 65°, de façon à tuer le mycélium, on laisse refroidir vers 30° et on continue le vide jusqu'à provoquer une ébullition tumultueuse des liquides de culture ; on est certain de cette façon de recueillir complètement l'air des appareils. Le volume de l'atmosphère gazeuse après l'expérience étant déterminé, on en fixe la composition par l'analyse eudiométrique, et de sa richesse en azote on déduit le volume de l'atmosphère initiale fournie aux cultures ; on a ainsi tous les éléments cherchés ; on recueille également le mycélium et on en établit le poids ; mais il est impossible de recueillir intégralement l'alcool non consommé.

Les appareils d'analyse qui m'ont servi ne présentent pas de robinet ; ce sont : la pompe, le volumètre et l'eudiomètre de M. Schlœsing fils.

Le tableau suivant résume les résultats fournis par deux expériences réalisées dans ces conditions. Les volumes gazeux sont ramenés à 760 et à 0°.

TABLEAU V

		Sucre interverti.	Alcool.
Poids du mycélium...........	mgr.	211	96,2
Durée de l'expérience.........	jours.	4	6,41
Matière consommée..........	mgr.	630	—
CO^2 dégagé..................	c. c.	251,73	93,93
— poids....................	mgr.	495	184,7
— par unité de temps et de poids.		0,58	0,29
O consommé.................	c. c.	213,66	184,85
— poids............	mgr.	305	164,36
par unité de temps et de poids.		0,36	0,60
Rapport $\frac{CO^2}{O}$ en volume.................		1,17	0,508

Voici maintenant, les chiffres qui ont servi à calculer les éléments du tableau V.

TABLEAU VI

			Milieu sucré.	Milieu alcoolisé.
Volume d'air initial............		c. c.	1711,31	914,9
— d'air final............		—	1749,4	824
Composition centésimale de l'atmosphère.	Azote........	—	77,28	87,72
	Oxygène.....	—	8,33	0,88
	Acide carbon.	—	14,39	11,4
Composition absolue..	Azote........	—	1351,93	722,81
	Oxygène.....	—	145,72	7,25
	Acide carb...	—	251,73	93,93

Le tableau VI montre que la culture sur milieu alcoolisé avait consommé presque tout l'oxygène de l'atmosphère confinée au moment où l'on a mis fin à l'expérience; mais cela ne présente pas d'inconvénient, car le mycélium absorbe rapidement jusqu'aux dernières traces de ce gaz sans que son développement en souffre; l'ascension progressive de la colonne mercurielle dans le tube manométrique en témoigne; de plus, quand tout l'oxygène a disparu, la colonne de mercure reste stationnaire; elle traduit fidèlement les oscillations barométriques pendant des semaines et des mois, si on laisse les choses en l'état; ceci prouve que le mycélium, quoique affamé, ne libère pas le carbone de sa propre substance à l'état d'acide carbonique, en l'absence d'oxygène; et cependant, on sait qu'un végétal affamé est le siège de transformations diastasiques actives qui portent sur les matières albuminoïdes.

Puisqu'on n'observe pas de dégagement d'acide carbonique, il faut en conclure que les diastases capables de dégrader les matières azotées, en l'absence d'oxygène, ne peuvent pas produire d'acide carbonique; la zymase n'a pas son analogue parmi les diastases des matières quaternaires de l'eurotiopsis Gayoni. C'est une observation que j'ai déjà faite chez le pois; il semble donc qu'elle soit générale chez les végétaux aérobies.

Lorsque les cultures en milieu sucré sont privées d'oxygène, la fermentation alcoolique apparaît; on constate un dégagement d'acide carbonique qui se poursuit tant qu'il reste du sucre, mais quand il est complètement terminé, on observe l'état stationnaire indéfini de la colonne mercurielle dans le tube manométrique.

Pour obtenir des résultats probants avec les milieux sucrés, il faut mettre fin aux expériences avant que l'oxygène ait été consommé. Les chiffres du tableau VI montrent que cette condition a été réalisée dans l'expérience dont j'ai donné les résultats.

Parmi les chiffres qui doivent attirer l'attention dans le tableau V, ce sont ceux qui donnent la valeur du quotient respiratoire qui sont les plus importants. Le chiffre 1,17 fourni par la culture en milieu sucré est légèrement supérieur au chiffre réel pour la raison que j'ai déjà donnée ; mais il n'en est pas moins vrai que si on le compare au chiffre 0,508 fourni par la culture en milieu alcoolisé, on constate qu'il existe entre eux la relation prévue. Nous avons donc ici un argument de plus à ajouter à ceux, déjà nombreux, que nous avons recueillis en faveur de la thèse soutenue dans ce travail; mais celui-ci présente l'avantage d'être dégagé de toute complication relative à la présence de matières quaternaires. Il prouve une fois de plus que l'absorption d'oxygène ne commence qu'à partir du moment où le sucre est déjà dédoublé en alcool et acide carbonique ; cela revient à dire que l'alcool s'accumule dans les milieux de culture ou dans les tissus végétaux parce que la cellule ne peut pas l'utiliser en l'absence d'oxygène, ou encore que le dédoublement du sucre en alcool et acide carbonique est une transformation physiologique dont le but immédiat est de préparer l'assimilation de la fraction utilisable du sucre.

A côté de ces résultats, j'ai mis en relief, dans le tableau V, quelques autres données qui semblent constituer des caractères distinctifs des deux modes d'alimentation. Ce sont les quantités d'acide carbonique et d'oxygène dégagé ou absorbé par l'unité de poids de culture, dans l'unité de temps.

Les chiffres ne présentent cependant rien de précis, en ce qui concerne l'oxygène; par contre, ils semblent fournir au sujet de l'acide carbonique une indication utile ; il n'y a pour-

tant là qu'une simple coïncidence; et comme je vais maintenant passer à l'examen de ces irrégularités, qui peuvent se traduire quelquefois par des régularités accidentelles, je dois dire que l'on ne peut pas non plus accepter sans réserves les notions de même ordre fournies par les tableaux I et II.

Quelle importance faut-il accorder à la durée des cultures et au poids du mycélium obtenu, dans l'usage provisoire que j'en ai fait? La notion de temps et de poids, employée telle quelle, ne fournit aucun renseignement précis.

On conçoit, en effet, que le poids de mycélium obtenu dans un temps donné ne peut être comparable d'une expérience à l'autre qu'autant que l'on opère avec un même milieu et dans des conditions identiques; il ne l'est plus dès que la durée des cultures varie. C'est qu'en effet le poids de la culture n'est pas proportionnel au temps, et, d'un autre côté, il n'y a aucune raison d'admettre que la dépense d'entretien des cellules formées est constante d'un bout à l'autre de l'expérience, au contraire.

On n'est donc pas fondé à tirer des conclusions précises de données qui ne peuvent en fournir; et si on le fait quand même, on tombe dans l'arbitraire.

Le poids final de la culture n'est pas mieux défini que le temps; ce n'est pas la somme de substance vivante obtenue qui a consommé pendant toute la durée de l'expérience; la dépense d'entretien est due à un poids de mycélium variable d'un instant à l'autre.

Je condamne ainsi, en apparence, un procédé de raisonnement que j'ai appliqué aux végétaux supérieurs dans le premier mémoire; mais là, les conditions de croissance sont différentes; le développement peut être considéré comme à peu près proportionnel au temps, tant que les réserves ne sont pas épuisées; de sorte que si les augmentations de poids des plantules dans l'unité de temps, suivant les espèces végétales, sont entre elles comme 1, 2, 3, etc... par exemple, les poids définitifs à la fin de l'expérience seront également proportionnels à 1, 2, 3, etc... de sorte que les résultats présentent entre eux des rapports constants, et cela suffit lorsqu'on établit seulement des comparaisons.

Pour arriver à interpréter convenablement les résultats fournis par l'eurotiopsis, il faut définir plus exactement ce

qu'est le poids d'une culture et préciser davantage la notion de temps.

III

M. Duclaux a symbolisé par une formule le travail de la vie cellulaire[1]. Les aliments servent à la construction des cellules ou à leur entretien. Si on désigne par S la somme des aliments consommés par une culture d'eurotiopsis, par C la quantité employée à la construction du végétal, E celle qui est affectée à l'entretien, ces trois quantités sont liées par la relation suivante :

$$S = C + E.$$

C peut être mis sous la forme a P, P étant le poids de mycélium obtenu à la fin de l'expérience, et a un coefficient exprimant la quantité d'aliment employé à la construction de l'unité de poids de plante.

E dépend du temps et du poids P, on peut donc faire :

$$E = b \frac{P}{n} t.$$

$\frac{P}{n}$ est ce que l'on peut appeler le poids moyen de la culture, c'est-à-dire une quantité constante pendant toute la durée de l'expérience qui consomme pour son entretien la même somme d'aliment que la culture elle-même.

La dépense d'entretien calculée à l'aide du poids moyen est donc proportionnelle au temps, ce qui justifie l'expression précédente; b est la dépense d'entretien par unité de poids et de temps.

De sorte qu'en définitive on a :

$$S = a\,P + b \frac{P}{n} t. \quad (1)$$

C'est la formule proposée par M. Duclaux.

Pour éviter les complications de calcul, je considérerai S comme représentant seulement la somme des aliments ternaires qui ont contribué à l'alimentation de l'eurotiopsis; comme P est constitué en partie, à peu près 5 0/0, par de l'azote emprunté à l'ammoniaque et à l'acide nitrique, les coefficients a et b, déduits par le calcul, seront inférieurs aux coefficients réels, puisque le

1. *Traité de microbiologie*, t. I et III, Masson, Paris.

premier membre ne renferme pas l'azote utilisé; mais ils demeureront comparables entre eux d'une expérience à l'autre.

M. Duclaux a appliqué cette formule à l'étude des résultats fournis par M. Laborde sur l'alimentation hydrocarbonée de l'eurotiopsis, et pour cela, faute de renseignements, il a considéré n comme égal à 3, chiffre déduit par M. Hansen de l'étude de la multiplication de la cellule de levure.

Il a admis en outre, comme conséquence de la revision méthodique des notions apportées par l'étude de la vie de la levure, que a doit être voisin de 2 pour la levure, 2 étant cependant une valeur approchée par excès; pour l'eurotiopsis, il a fait $a = 1,5$.

Je n'ai pas besoin d'entrer dans de longues explications pour faire comprendre que, d'après les notions acquises dans le cours de ce travail, on doit trouver pour b la même valeur, que le champignon soit nourri de sucre ou d'alcool, puisque les deux modes d'alimentation se confondent; mais ce n'est pas S qu'il faut employer dans le cas du sucre, mais bien $\frac{S}{2}$ puisque la moitié du poids du sucre est perdue pour la cellule, à l'état d'acide carbonique. D'autre part, l'expérience nous apprend que $a = 1$ pour l'alcool.

Cette formule se prête donc à une nouvelle vérification des conclusions tirées de mes expériences.

J'utiliserai d'abord les éléments de calcul fournis par les résultats de M. Laborde. (V. Duclaux, *loc. cit.*) Ce sont les suivants :

Nature de l'aliment.	Valeur de S.	Valeur de P.	t.
Sucre interverti...............	100	29	6
Alcool.........................	100	44	12

En portant ces chiffres dans la formule

$$S = a\,P + b\,\frac{P}{3}\,t.$$

et en faisant $a = 1$ puisque l'alcool est la fraction utilisée, on a :

$$\text{Pour le sucre}\quad 50 = 29 + b\,\frac{29}{3}\,6 \text{ d'où } b = 0,27$$

$$\text{Pour l'alcool}\quad 100 = 44 + b\,\frac{44}{3}\,12 \text{ d'où } b = 0,31$$

Ces chiffres, comme on le voit, sont suffisamment voisins pour justifier les prévisions; on n'a pourtant pas le droit d'y

voir autre chose, pour le moment, qu'une simple coïncidence, et voici pourquoi :

On a admis que $\frac{P}{n}$ est égal à $\frac{P}{3}$; c'est une supposition manifestement erronée ; les cultures d'eurotiopsis n'augmentent pas suivant la même loi que la levure ; le développement est lent au début, mais quand le mycélium recouvre complètement la surface du liquide d'un mince voile dont les filaments s'élèvent de quelques millimètres dans l'air, l'accroissement du poids de la culture devient extrêmement rapide; si donc, on veut tirer parti de cette formule si avantageuse, il faut déterminer par l'expérience la valeur du poids moyen $\frac{P}{n}$ pour chaque aliment offert au champignon.

J'ai fait cette détermination pour le sucre interverti et pour l'alcool. Les milieux additionnés de sucre interverti à la dose de 5 0/0 étaient placés dans des fioles coniques de 250 c. c. à raison de 50 c. c. par récipient; on introduisait dans chaque récipient la même quantité de semence formée par des spores recueillies sur une culture jeune et soumises à une germination préalable de 24 heures. Les cultures ont été faites à la température de 30°.

L'alcool était offert à la concentration de 3 0/0; mais on n'utilisait que 25 c. c. de liquide au lieu de 50, et on prenait toutes les précautions possibles pour réduire les pertes par évaporation et pour évaluer celles qui se produisaient quand même.

On prélevait à des intervalles indiqués dans les tableaux ci-dessous une culture de la série : on déterminait le poids de mycélium fabriqué et la quantité d'aliment consommé. Pour obtenir des résultats aussi comparables que possible, on écartait soigneusement toutes les cultures qui présentaient la moindre irrégularité dans la formation du voile.

Le tableau VII résume les résultats relatifs au sucre interverti ; le tableau VIII a été obtenu avec les cultures en milieu alcoolisé.

TABLEAU VII

Nos d'ordre.	Durée de l'expérience jours et heures.	Poids du mycélium mgr.	Sucre consommé mgr.	Rendement p. 100.
1.	2 j.	11,2		—
2.	2 j. 15 h.	38,8	100,6	38,56
3.	3 — 3 —	129,1	385,5	33,48
4.	3 — 15 —	182	537,7	33,8
5.	4 — 3 —	260,1	811,5	32
6.	5 — 15 —	386,8	1289,5	30,71
7.	6 — 15 —	452,3	1651,3	27,4

TABLEAU VIII

ALCOOL

1.	3 j. 16 h.	12,8	—	—
2.	4 — 16 —	42	42	—
3.	5 — 16	153	192	79,68
4.	6 —	227,7	325	70,
5.	6 — 16	342,3	640	53,48

Des courbes traduiront, mieux que les chiffres, la marche générale du développement des cultures; la courbe figure 1 représente le tableau VII; la courbe figure 2 correspond au tableau VIII; elles traduisent la loi du développement dans le

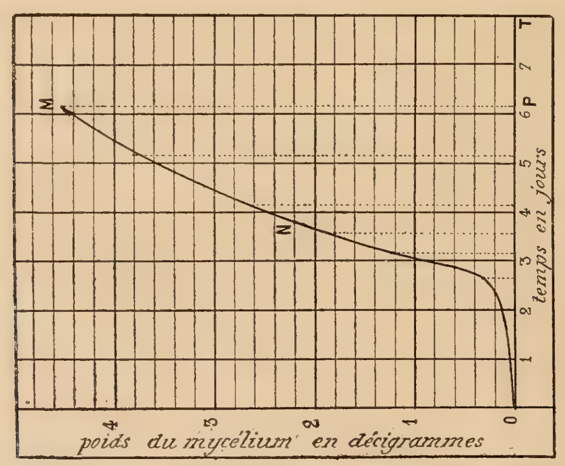


Fig. 1. — Développement de l'Eurotiopsis sur milieu sucré.

temps; on peut se convaincre aisément que ces courbes s'écartent beaucoup de la forme parabolique.

Elles permettent aussi de juger de l'allure tout à fait différente des cultures suivant qu'on leur offre du sucre ou de l'alcool; à ce point de vue, elles matérialisent les diverses obser-

vations que j'ai signalées dans le cours de ce mémoire, concernant le temps mort du début, la proportionnalité du développe-

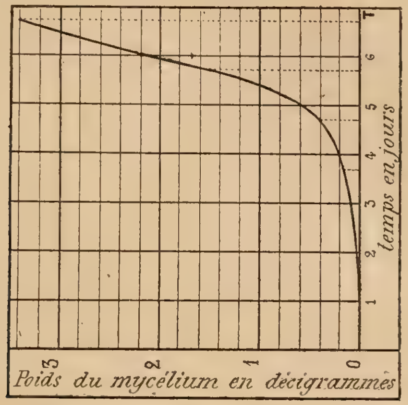


Fig. 2. — Développement de l'Eurotiopsis sur milieu alcoolisé.

ment au temps, la vitesse de l'accroissement de poids, etc. ; elles montrent en effet combien les cultures sur alcool sont pénibles au début, bien que la semence ait été fournie au même état de développement que celle qui a servi pour les cultures en milieu sucré, et qu'on ait pris la précaution de réduire de moitié le volume du liquide de culture, afin de diminuer autant que possible la durée du temps mort; mais une fois le voile formé, l'accroissement de poids ne le cède en rien aux cultures sur milieu sucré.

Les courbes se comprennent d'elles-mêmes; elles vont nous fournir le poids moyen des cultures; considérons, en effet, l'aire OPMN ; elle est proportionnelle à la dépense d'entretien de la culture 7 (voir Duclaux, *loc. cit.*, t. III, p. 61); or cette aire est équivalente au rectangle qui a pour base OP et pour hauteur l'ordonnée moyenne de la courbe; c'est donc cette ordonnée moyenne de la courbe qui est le poids moyen cherché; l'aire OPMN s'obtient assez exactement, par l'emploi d'un certain nombre de méthodes; j'ai appliqué dans le cas actuel la méthode de Simpson; connaissant l'aire OPMN et la base OP du rectangle équivalent, on en déduit le poids moyen de la culture 7; on comprend que l'on puisse obtenir aussi facilement les poids moyens correspondant aux cultures 6, 5, 4, etc., en considérant les portions de courbe relatives à ces cultures. Le

rapport de l'ordonnée moyenne à l'ordonnée maximum fournit les valeurs $\frac{1}{n}$. Voici les chiffres obtenus de cette façon, pour les cultures en milieu sucré et alcoolisé :

TABLEAU IX

Sucre interverti.		Alcool.	
Culture n° 4.......	0,20	Culture n° 3.......	0,11
— n° 5.......	0,24	— n° 4.......	0,14
— n° 6.......	0,32	— n° 5.......	0,16
— n° 7.......	0,37		

Si on porte ces valeurs dans la formule I, et qu'on y fasse $1/n$ = 0,20, 0,24, etc., on obtiendra les valeurs correspondantes de b : j'ai fait ce calcul en admettant que la quantité d'aliment utilisé S représente seulement la moitié du poids de sucre consommé. En faisant le même calcul pour les cultures en milieu alcoolisé, on en tire également les valeurs de b relatives à ces cultures.

Le tableau X donne les différentes valeurs ainsi calculées:

TABLEAU X

Sucre interverti.		Alcool.	
Culture n° 4.......	0,65	Culture n° 3.......	0,40
— n° 5.......	0,43	— n° 4.......	0,67
— n° 6.......	0,34	— n° 5.......	0,81
— n° 7.......	0,33		

Les deux séries de chiffres du tableau X ne présentent, comme on le voit, aucune relation l'une avec l'autre, ou tout au moins elles sont complètement différentes du résultat auquel on pensait aboutir; on peut traduire ce résultat de la façon suivante : l'eurotiopsis cultivé sur milieu sucré consomme, pour son entretien, des quantités décroissantes d'aliments avec le

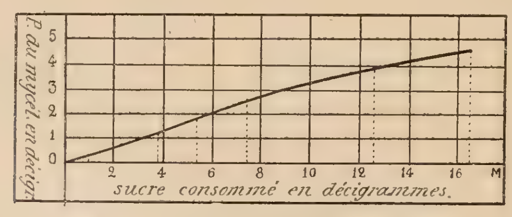


Fig. 3. — Courbe du rendement (milieu sucré.)

temps; nourri avec de l'alcool, il dépense, pour son entretien, des rations alimentaires qui vont en croissant avec le temps.

Nous sommes ainsi bien loin de la concordance observée dans les chiffres fournis par l'exemple tiré des données de M. Laborde ; cela tient à ce que la valeur du poids moyen P/3,

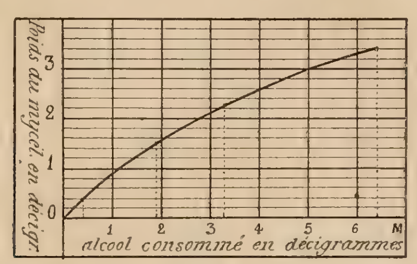


Fig 4. — Courbe du rendement (milieu alcoolisé).

dont nous avons fait usage, s'accorde très bien avec le chiffre réel fourni par l'expérience dans le cas de l'alimentation hydrocarbonée, mais s'éloigne au contraire beaucoup de celui que l'on obtient lorsqu'on offre de l'alcool au champignon.

Si singuliers que ces résultats paraissent, nous les avons déjà enregistrés, mais sous une forme beaucoup moins frappante, de sorte qu'ils n'ont pas attiré l'attention. Je les ai traduits dans le rendement des tableaux I et II; et ici ils constituent un mode d'expression des valeurs du rendement des tableaux VII et VIII. Avec les cultures en milieu sucré, le rendement décroît de 38,56 à 27,4 en 4 jours, tandis qu'avec les cultures en milieu alcoolisé, il baisse en 1 jour de 79,68 à 53,48. Les courbes figure 3 et figure 4 traduisent ces variations. Le rendement est le rapport de l'ordonnée à l'abscisse correspondante.

Au point de vue physiologique, ces résultats signifient que l'eurotiopsis soumis à l'alimentation hydrocarbonée vieillit très vite, car une cellule qui consomme activement doit être considérée comme plus robuste, plus jeune qu'une autre où les échanges nutritifs sont très ralentis. L'alcool semble produire un effet inverse sur l'activité des cellules : plus elles vieillissent, plus elles consomment, du moins en apparence.

Je ne puis rattacher ces faits qu'à l'influence de l'aération, qui se traduit, pour ainsi dire, d'une manière inverse, sur les deux modes d'alimentation.

Dans le cas de l'alimentation hydrocarbonée, le mycélium

émerge très rapidement; mais les filaments aériens restent courts; quand le champignon est nourri d'alcool, son développement est extrêmement pénible au début; mais quand le voile est bien formé, les filaments aériens s'allongent relativement beaucoup. Au point de vue de ses relations avec l'air ou le liquide, la culture se divise donc en deux parties : la partie aérienne et la partie immergée; c'est celle-ci qui se forme la première; elle est placée dans des conditions défavorables pour consommer l'alcool; les cellules qui la composent en absorbent donc peu ; la portion aérienne est placée, au contraire, dans les meilleures conditions pour le consommer activement; et plus elle augmente par rapport à la première, plus la dépense d'entretien s'accroît. C'est donc en apparence, seulement, que les cellules semblent se rajeunir; la relation si étroite de l'alimentation en alcool avec les exigences en oxygène n'apparaît pas ici pour la première fois; on l'a observée également avec le pois, 1er mémoire p. 203; mais la façon dont elle se manifeste dans le cas de l'eurotiopsis montre qu'un végétal aérobie est incapable de se nourrir d'alcool s'il n'est pas en rapport direct avec l'oxygène libre; s'il ne dispose que de l'oxigène dissous, il végète très péniblement, même lorsque l'alcool constitue pour lui un aliment de 1er ordre.

En ramenant à l'influence de l'air les différences dans le mode de développement de l'eurotiopsis, suivant qu'il est nourri de sucre ou d'alcool, je ne fais qu'un rapprochement; la raison nous échappe jusqu'à présent; mais il est clair que la cause essentielle de ces différences tient à la présence de la zymase ou à son absence.

Lorsque le champignon est cultivé sur milieu sucré, la zymase est pour lui une diastase indispensable; quand on lui offre de l'alcool, il n'en a plus besoin ; mais la zymase est une diastase très oxydable, autant du moins que Buchner l'a montré; si elle disparaît au bout d'un certain temps, les cellules qui en sont privées ne doivent plus avoir qu'une action très limitée ou nulle sur le sucre; elles sont affamées, et dès lors elles brûlent leur propre substance à l'exemple de toutes les cellules privées d'aliments. Nous arrivons ainsi une fois de plus à admettre que la zymase, contrairement à toutes les conceptions actuelles, est une diastase normale chez les végétaux, qui prend nais-

sance comme toutes les autres diastases cellulaires, pendant la vie végétative. Si elle persiste dans la vie anaérobie, c'est parce qu'elle se détruit plus ou moins vite suivant les espèces végétales; elle doit être toujours présente dans les cellules jeunes d'eurotiopsis, quoique développées au large contact de l'air. Il en est de même chez les levures ; mais, par contre, l'aspergillus nous apparaît, ainsi que les végétaux supérieurs, comme des organismes où la zymase s'oxyde avec la plus grande facilité, si bien qu'on n'en trouve jamais que des traces.

Toutes ces déductions seront vérifiées, point par point, dans un autre mémoire. Pour le moment, je vais résumer les recherches relatives au vieillissement des cultures; cette étude permettra d'élucider quelques points que j'ai laissés dans l'ombre, en même temps qu'elle fournira quelques renseignements au sujet de la variation de la composition élémentaire du mycélium d'eurotiopsis.

IV

Le mycélium d'eurotiopsis est relativement riche en matières saccharifiables. Pour les évaluer, j'ai soumis les cultures pulvérisées, à l'état sec, avec du sable très fin, à l'action de l'acide sulfurique à 2 0/0, à la température de 120° pendant 20 minutes ; les corps réducteurs obtenus de cette façon ont été dosés par la méthode de Lehmann, modifiée par Maquenne.

Le tableau XI donne les résultats obtenus avec des cultures développées sur milieux sucré et alcoolisé. Pour entourer ces résultats de tous les renseignements utiles, j'ai fait les évaluations sur les cultures des tableaux VII et VIII. Voici les chiffres qu'elles ont fournis :

TABLEAU XI

	Désignation des cultures.	Matières saccharifiables p. 100 de poids sec.
Milieu sucré.	Cultures 6 + 7 tableau VII	24,3
	Culture de 3 jours	18,87
Milieu alcoolisé.	Cultures 4 + 5 tableau VIII	16,41
	Cultures 6 + 6 tableau VIII	24,78
	Autre culture conservée 18 jours à l'étuve à 30°	
	Après la disparition de l'alcool	42,58

Plus la culture vieillit, plus la quantité de matières saccharifiables augmente, et la production des matières hydrocarbonées se poursuit activement en l'absence de tout aliment; cela prouve que ces substances prennent naissance par voie de désassimilation; or ces composés présentent beaucoup d'analogie avec les celluloses vraies ; parmi eux, une certaine portion doit d'ailleurs provenir de ces dernières ; je n'ai pas suivi les conventions établies pour séparer ces matières saccarifiables des celluloses vraies; j'ai forcé un peu la dose d'acide.

C'est là une observation intéressante, car les physiologistes admettent unanimement que les celluloses dérivent du sucre par un phénomène de condensation moléculaire, dont l'amidon est un autre exemple, à un état de polymérisation moins avancée.

Pour ce qui est des cultures en milieu alcoolisé, le doute n'est pas possible, au sujet de l'origine qu'elles assignent aux celluloses; car le mycélium n'y a jamais disposé d'une seule molécule hydrocarbonée en dehors de celles qu'il s'est constituées, et nous verrons plus loin qu'il ne fabrique pas de glycogène.

Quant aux cultures qui se sont développées aux dépens du sucre, elles doivent tout naturellement élaborer les enveloppes cellulosiques du mycélium par la condensation du sucre; c'est encore une illusion; la diminution de la dépense d'entretien *b* avec l'âge de la culture montre que le mycélium relativement jeune consomme peu de sucre; j'ai même ajouté qu'il n'en absorbe pas du tout, et je l'établirai par l'étude de l'apparition et de la destruction de la zymase; mais cela n'empêche pas que dans les cellules dépourvues de zymase, les matières saccharifiables augmentent avec l'âge, exactement comme dans les cultures en milieu alcoolisé, après la disparition complète de l'alcool. On doit donc admettre qu'ici encore, ces corps se forment par voie de désassimilation des matières albuminoïdes.

Ainsi, la physiologie assigne aux celluloses une origine toute différente de celle de l'amidon, si toutefois on peut se permettre de généraliser l'exemple de l'eurotiopsis ; on comprend donc qu'elles puissent être constituées par des polymères des sucres en C^5 et C^6, unis à d'autres substances que l'on ne connaît pas, car la saccharification des celluloses fournit des corps résiduels non encore définis, tandis que l'amidon issu des

glucoses se résout toujours, en son constituant, le dextrose.

La formation des membranes cellulosiques est une fonction normale et nécessaire des cellules végétales; mais elle caractérise surtout la période de dégénérescence, celle où le protoplasma, privé d'aliment ou incapable d'utiliser celui dont il dispose, s'oxyde ou se détruit rapidement, faisant ainsi passer la cellule de la fonction active de multiplication à la fonction passive d'organe de soutien ou de transport; et plus la cellule vieillit vite, et plus économiquement elle remplit son rôle.

La désassimilation des matières azotées n'est pas accompagnée seulement de production de substances cellulosiques; il y a également appauvrissement du mycélium en azote et perte de carbone et d'hydrogène par voie d'oxydation.

Voici, pour donner une idée de l'activité de ces phénomènes, quelques chiffres fournis par des cultures en milieu alcoolisé, appartenant à la même série que celles du tableau VIII, mais qui avaient été conservées à l'étuve, longtemps après la disparition complète de l'alcool.

Le n° 1 a été arrêté à peu près au moment où les dernières traces d'alcool venaient d'être absorbées.

TABLEAU XII

Nos d'ordre.	Age des cultures jours et heures.	Poids du mycélium mgr.	Perte de poids calculée d'après le n° 1 mgr.	Poids de l'extrait mgr.	Augmentation de l'extrait calculée d'après le n° 1 mgr.
1.	6.17	329,7	—	86.8	—
2.	7.17	308	21.7	92.6	5.8
3.	15	227	102.7	95.8	9
4.	25	195	134,7	108	21,2
		199	130,7	108	21,2

Le tiers du poids des cultures a disparu au bout de 25 jours, à l'état d'acide carbonique et d'eau, pendant que l'extrait a augmenté seulement de 2 centigrammes; les matières saccharifiables ont passé de 24,78 à 42,58 0/0 (V. tableau XI). Le taux de l'azote voisin de 6 est tombée à 3 0/0 environ; ce sont donc les résidus azotés de la désassimilation qui ont contribué à l'augmentation de l'extrait.

Mais ces faits ne comprennent pas toute l'histoire du vieillissement du mycélium d'eurotiopsis.

Le champignon à l'état jeune renferme beaucoup de matières oléagineuses, qui disparaissent également avec l'âge.

Le tableau XIII montre dans quelle proportion ces substances se rencontrent dans le mycélium; les cultures ont été réalisées sur milieu alcoolisé à 4 0/0; le n° 3 a été conservé dans des conditions de vie anaréobie, pendant 28 jours, à partir du moment où le n° 1 a été arrêté.

Pour évaluer les matières grasses, j'ai pulvérisé le mycélium à l'état sec avec du sable silicieux; l'épuisement a été fait avec de l'éther sec.

TABLEAU XIII

Nos d'ordre.	Désignation des cultures.	Durée de conservation.	Matières grasses p. 100 de poids sec.
1.	Témoin................	—	20,78
2.	Culture à l'air..........	28 jours.	2,62
3.	Culture anaérobie.	28 —	21,48

La disparition des matières grasses à l'air est susceptible d'apporter quelque complication au mécanisme de formation des celluloses, tel que je l'ai expliqué plus haut ; il se peut que les matières azotées fournissent indirectement les matières cellulosiques en passant par l'intermédiaire des substances oléagineuses ; je n'ai pas eu le loisir d'approfondir les relations entre les trois catégories de composés — matières albuminoïdes, matières grasses et substances hydrocarbonées ; l'intérêt que présente cette question mérite qu'on y revienne.

Les observations faites dans le cours de ce chapitre vont nous permettre de reprendre la critique des chiffres du tableau III. Ils présentent, en effet, une anomalie dont je n'ai pas encore fourni l'explication. Mais avant d'insister sur ce point, je dois dire que l'intérêt du rapprochement en question, qui était plausible au moment où il a été fait, ne présente plus qu'un attrait historique. J'ai montré, en effet, dans la suite, que le mycélium d'eurotiopsis demeure capable de consommer de l'alcool, beaucoup plus longtemps qu'il n'est apte à absorber du sucre ; il en résulte que tout en conservant une composition relativement plus constante, le mycélium brûle plus complètement l'alcool, si bien que dans la façon de traduire les résultats, adoptés dans le tableau III, on retrouve plus exactement l'origine de l'acide carbonique avec les cultures faites sur milieu alcoolisé, qu'avec celles qui se sont développées aux dépens du sucre; celles-ci ont subi dans leur constitution des modifica-

tions plus profondes par voie de désassimilation, et lorsqu'on les considère comme formées d'alcool et d'ammoniaque, on est loin de la réalité. La justesse de cette critique est appuyée par la comparaison des chiffres du tableau XIV; il en résulte que l'écart entre les chiffres obtenus par le calcul et ceux qui sont fournis par l'expérience doit être mis sur le compte de la perte de carbone par la désassimilation des matières albuminoïdes; l'azote éliminé entraîne avec lui une certaine fraction de carbone qui se trouve dans le liquide de culture, et c'est pour cela que cet élément s'obtient intégralement dans le bilan que j'ai dressé p. 354.

Mais à côté de cette interprétation, il y en a une autre qui vient également à l'esprit; elle s'appuie sur la présence possible d'une certaine réserve de glycogène dans le mycélium d'eurotiopsis. Si le champignon emmagasinait le sucre à l'état de glycogène, on devrait retrancher du sucre consommé la portion employée à constituer cette réserve, de même qu'il faudrait diminuer d'autant le poids du mycélium obtenu; car ce sucre n'a pas été assimilé, et dans mes calculs j'ai admis le contraire.

J'ai cherché vainement à établir le bien-fondé de cette supposition. La réaction micro-chimique de l'iode ne peut fournir de garantie sérieuse, car le contenu du mycélium âgé de deux ou trois jours se résout en une masse granuleuse dont les éléments se colorent, plus ou moins fortement, en jaune par l'iode.

J'ai soumis au traitement à l'eau bouillante pendant 6 heures du mycélium pulvérisé aussi finement que possible; le liquide filtré et traité par l'acide sulfurique à 2 0/0 à 120° pendant 20 minutes a fourni seulement, en matières réductrices évaluées en glucoses, 2 0/0 du poids du mycélium traité. Ce chiffre est trop faible pour être rapporté à des substances autres que les matières gommeuses qui se dissolvent peu à peu dans l'eau bouillante. Cette épreuve, que j'ai répétée plusieurs fois sur plusieurs échantillons de cultures jeunes obtenues sur des milieux à 5 et 10 0/0 de sucre, ne m'a jamais fourni de résultat plus concluant; et cependant la culture qui a donné, dans ces conditions, 2 0/0 de substances réductrices renfermait 18,87 0/0 de matières saccharifiables.

La démonstration de l'absence de glycogène est plus facile à faire avec des cultures obtenues sur milieu alcoolisé. Je l'ai

faite d'une manière indirecte sur la culture n° 3 du tableau XIII.

Lorsque le ballon dont l'atmosphère interne avait à peu près 1 litre de capacité a été bouché, la disparition de l'oxygène aurait dû être suivie d'une fermentation lente du glycogène, comme cela se produit avec la levure; mais je n'ai jamais observé la moindre dénivellation du niveau du mercure dans le tube à dégagement dont le bouchon était muni, après l'absorption complète de l'oxygène qui, avec une culture ayant fourni 2 grammes de matière sèche, à la fin de l'expérience, devait être complète au bout de 2 h. 40, d'après les données du tableau IV. Le mycélium d'eurotiopsis ne renferme donc pas de quantités sensibles de glycogène. C'est bien aux modifications causées par le vieillissement qu'il faut rapporter la contradiction relevée dans les chiffres du tableau III.

L'absence de glycogène va nous permettre de traduire par la composition élémentaire du mycélium les changements survenus dans la constitution de la substance vivante, suivant l'âge des cultures. Le tableau XIV les synthétise assez fidèlement; j'y ai réuni les chiffres relatifs à la composition centésimale d'un certain nombre de cultures dont l'histoire a été faite dans le cours de ce mémoire.

TABLEAU XIV

	Milieu sucré.		Milieu alcoolisé.				
	1	2	3	4	5	6	7
	Culture de 2 jours. Mycélium de 24 h.	Culture 3. Tableau I.	Culture 3. Tableau II.	Culture 4. Tableau XII.	Culture 1. Tableau XIII.	Culture 2. Tableau XIII.	Culture 3. Tableau XIII.
C.	56,48	51,67	50,45	43,99	53,38	46,86	54,23
H.	9,1	7,74	7,21	7,04	7,86	7,07	7,9
Az.	6,63	4,84	5,55	2,88	5,74	3,46	2,26
O + S	27,79	35,75	36,74	46,09	33,02	42,61	35,61

Je n'ai pas tenu compte des cendres; elles sont d'ailleurs négligeables, elles représentent seulement 1 à 2 0/00 du poids du mycélium; le liquide Raulin ne renferme en effet que des quantités très petites d'éléments minéraux non volatils au rouge.

Ces chiffres se prêtent encore à une vérification importante, indépendamment des renseignements qu'on leur a demandés.

Puisque le sucre ne fournit à l'eurotiopsis que la fraction de molécule qui se résout en alcool, il en résulte que la composition du mycélium, formé en apparence de sucre et d'ammoniaque, ne

doit présenter aucun rapport de constitution avec le sucre ; par contre on doit lui retrouver, à peu de chose près, la même composition centésimale que l'alcool uni à une proportion d'azote ammoniacal, déterminée par l'analyse.

Dans une note que j'ai communiquée à l'Académie des sciences[1], j'ai montré qu'il en est bien ainsi, mais on est en mesure ici d'approfondir un peu plus ce point particulier. On comprend qu'il n'est pas indifférent de s'adresser à la première culture venue, pour établir ce rapprochement ; les modifications causées par l'autophagie de la portion la plus âgée du mycélium sont assez importantes pour imposer le choix de cultures très jeunes, si l'on veut se faire une idée aussi exacte que possible des rapports des éléments empruntés à l'alcool et à l'ammoniaque pour édifier la substance vivante telle qu'elle se présente avant d'avoir été transformée par le travail d'entretien. J'examinerai donc les chiffres fournis par la culture 1 du tableau ci-dessus. Cette culture a été obtenue sur un milieu à 10 0/0 de sucre ; elle a été arrêtée 24 heures après l'apparition des premiers filaments aériens ; on a donc ainsi quelques chances d'opérer sur des cultures peu dégénérées, et par suite de composition à peu près homogène ; de plus, j'ai forcé à dessein la dose de sucre, afin de montrer que l'oxygène des hydrates de carbone ne se retrouve pas dans la substance vivante.

La combinaison imaginaire d'aldéhyde et d'ammoniaque (on verra tout à l'heure pourquoi je prends l'aldéhyde), qui répond à la condition imposée par l'analyse de contenir 6,63 0/0 d'azote environ, est de la forme

$$(C^2\,H^4O)^{13}\,(Az\,H^3)^3 = C^{26}\,H^{61}\,O^{13}\,Az^3$$

et présente la composition centésimale suivante ; j'ai placé en regard de ces chiffres ceux qui expriment la composition du mycélium jeune de la culture déjà indiquée :

TABLEAU XV

	$C^{26}\,H^{61}\,O^{13}\,Az^3$	Culture 1. Tableau XIV.
C.	50,08	56,48
H.	9,79	9,1
Az.	6,74	6,63
O	33,38	27,79

1. *C. R.*, janvier 1902.

On voit que l'hydrogène et l'oxygène sont en excès, dans le composé aldéhydique hypothétique. Pour l'hydrogène, cela se conçoit; l'ammoniaque perd de l'hydrogène en se fixant sur un radical organique; on sait d'ailleurs que les substances albuminoïdes ne renferment que des groupements azotés, moins hydrogénés que l'ammoniaque; mais on s'explique moins facilement la disparition de l'oxygène, car on est volontiers porté à admettre que la cellule vivante possède la faculté de faire intervenir l'oxygène libre dans les conditions de vie aérobie, au cours du travail d'organisation des matières protoplasmiques. Les faits semblent établir, au contraire, que l'excédent d'hydrogène apporté par l'ammoniaque s'élimine en entraînant une partie de l'oxygène emprunté à l'aldéhyde pour former de l'eau.

Voilà ce que l'on peut déduire des chiffres qui précèdent. Cependant, ce que j'ai dit au sujet de l'organisation de la matière vivante semble laisser entendre qu'elle se crée de toutes pièces en partant de composés très simples par une série de migrations d'atomes, et ce n'est qu'au moment où ce travail de synthèse a abouti aux substances protoplasmiques que les aliments prennent part à l'entretien de la vie.

Cette conception ne me paraît pas susceptible d'expliquer les manifestations extérieures du travail protoplasmique. La division du travail cellulaire en travail de construction et d'entretien est une spécialisation imaginaire, simple et commode pour la dissociation des idées, en même temps que très avantageuse au point de vue pédagogique; mais il ne faut pas la considérer comme une traduction de la réalité.

On comprend, en effet, que l'édifice moléculaire d'une substance protoplasmique puisse ne jamais se créer de toutes pièces; la semence qui l'a hérité de ses ancêtres le transmettra à ses descendants. Quand la germination commence, c'est le travail d'entretien qui apparaît; de sorte que la vie semble se manifester d'abord par un processus de désassimilation qui donne naissance à de l'acide carbonique, de l'eau, des hydrates de carbone insolubles, des matières grasses, des résidus azotés, etc.; cette usure réduit l'édifice moléculaire initial, l'entame en quelque sorte de tous les côtés, et c'est pour réparer ces pertes que l'être vivant fait des emprunts incessants aux aliments dont il dispose; mais il ne les prend pas sous les formes

où ils se présentent; il les prépare par un travail de digestion, les disloque, provoque des ruptures qui font naître des fonctions chimiques nouvelles douées de grandes affinités qui leur permettent de se combiner à l'édifice initial, de contrebalancer ses pertes, d'augmenter son poids. C'est dans ce dernier cas qu'il y a multiplication cellulaire et accroissement de substances vivantes.

Cette vue suppose que l'aldéhyde et l'ammoniaque préalablement unis ne franchiraient pas les degrés successifs d'une série de synthèses qui aboutiraient à la constitution des matières protéiques, mais s'uniraient au contraire, indépendamment l'une de l'autre, à la molécule albuminoïde, et c'est pour cela qu'on les retrouverait non pas en nature, mais en poids, à peu de chose près, dans le mycélium jeune.

Quoi qu'il en soit, la composition élémentaire de la cellule n'est jamais identique à elle-même d'un moment à l'autre; le résultat des modifications qu'elle subit consiste en un enrichissement en oxygène et en un appauvrissement en carbone hydrogène et azote. Il arrive donc un moment où les chiffres des deux colonnes du tableau XV concordent exactement. Cela se produit quand la composition du mycélium coïncide avec celle des cultures 2 et 3 du tableau XIV. Ce sont les deux exemples que j'ai donnés dans ma note des *C. R.* (janvier 1902). On constate cependant qu'il y a toujours un excédent d'hydrogène en faveur du corps aldéhydique hypothétique; j'ai indiqué l'origine de cet excédent d'hydrogène; si j'avais considéré l'alcool comme constituant la fraction utilisée du sucre, il eût été encore bien plus considérable.

L'étude de la composition du mycélium vient donc prouver, à son tour, que l'hydrogène de la fonction alcoolique est éliminé avant l'incorporation du carbone ternaire emprunté au sucre; c'est la meilleure démonstration que l'on puisse donner de ce fait dont j'ai été conduit à admettre l'existence, à la suite de nombreuses observations relatées dans le cours de ce travail.

V

CONCLUSIONS

Les deux modes d'alimentation de l'Eurotiopsis Gayoni étudiés dans ce mémoire sont complètement identiques en principe.

L'assimilation du carbone ternaire emprunté au sucre se réduit en définitive à l'incorporation de l'aldéhyde à la substance vivante.

L'alcool est incorporé aussi à l'état d'aldéhyde éthylique; il est superflu d'ajouter que l'aldéhyde est un produit transitoire, qui, dans les conditions normales de développement, ne se rencontre jamais à l'état libre dans le mycélium ou dans les liquides de culture.

Ces conclusions sont les mêmes que celles qui ont été déduites de l'étude des végétaux supérieurs, avec cette différence que celles-ci doivent être modifiées dans le sens indiquées par celles-là : ce n'est pas l'alcool qui est la substance incorporée par les plantules, c'est l'aldéhyde.

L'étude du rendement en substance vivante, des échanges gazeux entre l'eurotiopsis et l'atmosphère, celle de la composition élémentaire du mycélium confirment ces conclusions.

Si la nutrition hydrocarbonée de l'eurotiopsis et son alimentation en alcool se confondent en principe, il existe entre elles des différences que j'ai attribuées à la présence de la zymase, nécessaire à l'assimilation du carbone emprunté au sucre, inutile lorsque l'on offre directement de l'alcool au champignon.

ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE ET CHIMIQUE
DU ROUISSAGE AÉROBIE DU LIN

Par M. L. HAUMAN

Travail du laboratoire de botanique de l'Institut agricole de Gembloux.

Le rouissage des plantes textiles est le résultat de l'action des microbes, sur les corps pectiques qui constituent les lamelles mitoyennes des fibres, et la majeure partie des membranes des parenchymes qui entourent les faisceaux fibreux.

L'étude des microbes qui interviennent dans le rouissage du lin, sous l'eau, a été entreprise par MM. Winogradsky et Fribes [1] et M. Marmier [2].

Pour les deux premiers observateurs, ce serait l'œuvre d'une bactérie anaérobie, tandis que le dernier a trouvé un microbe aérobie capable, au contact de l'air, de rouir du lin stérilisé.

Comme le fait remarquer M. Duclaux [3], la qualité de rouir le lin ne semble pas être spécifique, mais paraît appartenir à des espèces multiples.

Telle sera la conclusion qui se dégagera des études actuelles. Elles ont pour objet non pas le rouissage sous l'eau, mais celui qui s'exécute à l'air, lorsqu'on dépose le lin à la surface des prairies ou des champs.

C'est le rouissage à la rosée ou *rorage*.

Il se pratique dans nos contrées en juillet-août et même en septembre. La filasse obtenue est de qualité moindre que dans le rouissage à l'eau ; la fibre est plus foncée, moins résistante que celle que donne le rouissage à l'eau courante.

Mais les deux procédés donnant, à cette remarque près, des résultats identiques, ils ne peuvent différer que par la nature des organismes qui en sont les agents.

1. *Comptes rendus*, t. CXXI, p. 742, 1895.
2. Cité par M. Duclaux, *Traité de Microbiologie*, t. IV, p. 453, 1901.
3. Id., p. 454.

I

ÉTUDE DES AGENTS DU ROUISSAGE

Il fallait tout d'abord étudier la flore microbienne des tiges du lin roui. Ce fut fait par la méthode ordinaire, sur plaques de Pétri, en milieux acides et alcalins ; ces analyses, plusieurs fois répétées et pour des lins de provenances différentes (Gembloux, Flandre, Hesbaye, Ardennes), ont permis de constater la présence des espèces suivantes :

Bacillus coli communis ;
Bacillus mesentericus fuscus ;
Bacillus fluorescens liquefaciens ;
Bacillus mycoïdes ;
Bacillus subtilis ;
Bacillus termo ;
Streptothrix Forsteri ;
Micrococcus roseus ;
Penicillium glaucum ;
Mucor mucedo ;
Cladosporium herbarum,

et des myceliums stériles d'autres champignons.

Comme il fallait s'y attendre, ce sont là des espèces banales de l'air et de la surface du sol. Il est évident que la présence de ces divers organismes sur le lin roui n'indique pas la participation de tous dans le rouissage ; les tiges examinées avaient longuement séjourné à l'air et avaient été plusieurs fois manipulées. Pourtant, l'abondance constante de certaines espèces montre leur influence prépondérante dans les phénomènes étudiés.

Il y a d'abord le *Cladosporium herbarum* qui envahit toutes les tiges et les noircit, ce qui fait croire dans les campagnes que, pour que le lin soit roui, il faut qu'il soit noir ; puis, et c'est la plus abondante des bactéries, le *B. coli*, dont j'ai isolé deux formes un peu différentes. J'ai observé aussi dans mes cultures sur plaques des colonies nombreuses du *B. mesentericus*, du *B. subtilis* et du *Streptothrix*.

Ce sont les diverses races ainsi isolées qui ont été utilisées dans la suite de ce travail.

Mais quels sont, parmi ces nombreux organismes, ceux qui sont capables de rouir ?

Pour le déterminer, j'ai réalisé des rouissages en tubes par des cultures pures de ces différents microbes.

La stérilisation des tiges de lin présentait une difficulté : le chauffage ordinaire à 120° produit une dissociation des fibres, ôtant toute valeur à l'expérience qui en est l'objet.

La stérilisation à sec, au four à flamber (150°), et celle par des vapeurs d'aldéhyde formique n'ont pas donné de résultats satisfaisants. J'en suis arrivé à chauffer à l'autoclave, sans dépasser 110°, le lin mis en tube sans liquide. Trois de ces chauffages réitérés à un jour d'intervalle produisent une stérilisation parfaite, sans altérer la consistance des tiges. M. Winogradsky relate des faits analogues dans son travail.

La question de stérilisation résolue, je me suis servi du dispositif suivant pour réaliser, *in vitro*, un rouissage aérobie, sans qu'il y eût danger d'infection. Un long tube de culture contenant le lin à rouir était fermé à l'aide d'un bouchon de liège, percé d'un trou livrant passage à un petit tube de verre. Ce bouchon était à son tour recouvert d'un épais tampon d'ouate.

Après stérilisation, pratiquée comme il a été dit plus haut, on introduisait, par le petit tube de verre, le liquide de culture (eau légèrement enrichie de bouillon ou de moût de bière, suivant la nature du microbe) et la matière d'ensemencement. Ce dispositif donnait toutes garanties de pureté et permettait d'agiter les tubes, afin de répandre sur le lin le liquide ensemencé avec les microbes à étudier.

Aux espèces énumérées plus haut, j'ai ajouté le *Sclerotinia Libertiana*, le *Botrytis cinerea* et l'*Aspergillus niger*.

Dans toutes mes expériences, avec les quatorze espèces banales indiquées, la dissociation des fibres était déjà obtenue après quinze jours. Cependant, j'ai constaté des différences d'intensité dans l'action de ces divers organismes. D'une façon générale, comme c'était à prévoir, les moisissures sont beaucoup plus actives que les bactéries : non seulement elles rouissent, mais encore elles attaquent la cellulose de la fibre, qui perd toute solidité. Le *Cladosporium herbarum* est heureusement la moins énergique, fait important, sans lequel le rouissage en prairie serait impossible.

Comme je ne recherchais pas de procédé pratique de rouissage en culture pure, je ne me suis pas attaché à comparer la valeur respective, comme agents rouisseurs, des différentes espèces. Au reste, l'intensité de l'action microbienne peut varier avec les races et avec les conditions de milieu. Toutefois, le *B. fluorescens* m'a semblé donner les plus beaux rouissages ; le *Streptothrix* attaque légèrement les fibres, comme les moisissures dont il est voisin ; enfin, l'activité du *Miccococus roseus* est faible.

Des expériences, qui ont duré un et deux mois, montrent que l'action microbienne, même très prolongée, est presque nulle sur la cellulose des fibres. La résistance de celle-ci n'avait que faiblement diminué et jamais aussi fortement qu'avec les moisissures citées plus haut.

Il résulte donc de ce qui précède que le rouissage n'est pas dû à un agent spécifique, mais qu'au contraire tous les microbes banaux de l'air et de la surface du sol peuvent exercer cette action sur les tiges.

Il paraît, du reste, moins logique ici que partout ailleurs de pousser à l'extrême la spécificité des actions microbiennes. En effet, qu'est-ce que le rouissage, sinon le début surveillé, conduit et arrêté à point des phénomènes généraux de réduction et destruction par les microbes des matières organiques mortes ?

L'action microbienne, dans le rouissage des fibres textiles, est depuis longtemps indiscutée ; mais on pouvait se demander, et spécialement dans le rouissage aérobie, si leur action n'était pas aidée par les agents atmosphériques. L'expérience suivante tend à élucider ce point :

Deux poignées de lin ont été exposées sur une prairie, dans les conditions ordinaires du rorage ; l'une y est restée toute la durée de l'expérience, tandis que l'autre, tous les deux ou trois jours, était plongée pendant une heure dans une atmosphère d'aldéhyde formique, de manière à empêcher tout développement microbien notable. La stérilité relative des tiges a, du reste, été contrôlée plusieurs fois, au cours de l'opération, qui a duré du 23 avril au 29 mai.

Pendant ce laps de temps, le lin a eu à subir des pluies abondantes, des rosées matinales, des gelées nocturnes et la chaleur parfois très forte du soleil. Le lin non stérilisé fut com-

plètement roui, tandis que l'autre n'a pas même subi un commencement d'altération.

L'action physique des agents extérieurs est donc nulle dans le rouissage en prairie ; c'est bien l'œuvre unique des organismes inférieurs.

II

ÉTUDE DU ROUISSAGE AU POINT DE VUE ANATOMIQUE ET CHIMIQUE

Les microbes et les moisissures produisent donc la dissociation des fibres textiles et leur séparation du cylindre ligneux central. Mais quelles sont les matières qu'ils attaquent pour arriver à ce résultat?

Il existe toute une série de réactifs colorants permettant de différencier la cellulose et les corps pectiques : les safranines, le bleu de méthylène, le bleu de nuit, le bleu de naphtaline R en cristaux, réactifs si bien étudiés par Mangin [1]. La phénosafranine m'a donné d'excellents résultats. Elle colore en jaune orangé les corps pectiques, tandis qu'elle teint en rouge cerise les parois ligneuses et subérifiées.

Une coupe de lin non roui, traitée par ce réactif, montre des faisceaux fibreux peu colorés, noyés dans le parenchyme cortical coloré en jaune orangé, grâce à la présence de membranes ou prédominent des composés pectiques. Entre les fibres, la lamelle mitoyenne qui est également de nature pectique a la même coloration.

Au contraire, sur une coupe de lin roui, on voit les fibres séparées les unes des autres, par suite de la digestion des lamelles mitoyennes, et l'on constate la disparition des éléments parenchymateux de l'écorce.

Ces résultats de l'étude microscopique sont confirmés par l'analyse chimique. J'ai trouvé des quantités notables de corps pectiques dans des lins non rouis et il n'y en avait plus dans les lins rouis. Ce fait avait déjà été observé par Frémy. Le rouissage est donc bien une destruction de corps pectiques.

Ce fait établi, j'ai voulu examiner de plus près la fonction digestive des bactéries et des moisissures vis-à-vis des corps pectiques.

1. Recherches anatomiques sur la distribution des composés pectiques chez les végétaux, *Journal de Botanique,* 1893.

Cette partie de mon étude a été facilitée par M. le professeur Droixhe, qui a bien voulu me procurer des quantités assez considérables de pectine provenant de ses recherches sur les corps pectiques, et m'aider de ses conseils sur les propriétés de ces substances. Je lui en suis très reconnaissant.

J'ai constaté que les bactéries et les moisissures (*B. coli*, *B. fluorescens*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger* et *Penicillium glaucum*) se développaient dans des solutions de pectines ainsi composées :

Eau	1,000 c. c.
Pectine	10 grammes.
Peptone	1 —
Phosphate d'ammoniaque	1 —
Sulfate de potasse	0gr,5
— de magnésie	0gr,2

Les liquides ensemensés se sont troublés et j'ai constaté la disparition de la pectine par l'abaissement du degré polarimétrique. Ainsi une solution marquant 2,2° au polarimètre, avant l'ensemencement, ne marquait plus que 0,4° après 10 jours pour l'*Asqergillus niger* et 1,1°, pour le *Cladosporium herbarum*.

Il convient de remarquer que le niveau primitif des liquides avait été rétabli dans les tubes de culture, et que l'on avait tenu compte de la quantité de pectine retenue par le filtre Chamberland. Cette correction s'impose, car une solution marquant 2,5° polarimétriques avant filtration à la bougie de porcelaine n'en marque plus que 2,2° après.

Certes, ce procédé ne donne pas la quantité précise de pectine disparue, car il se forme sans doute d'autres composés pectiques dont le pouvoir polarisant est différent. Néanmoins, on ne peut mettre en doute la diminution totale des corps pectiques dans les liquides de culture.

La pectine libre est probablement très rare dans la nature; aussi, j'ai repris ces expériences sur ce que l'on est convenu d'appeler pectate de chaux, combinaison plus ou moins parfaite de pectine et de chaux.

Le même liquide minéral a été employé, et on l'a additionné de 1,2 0/0 de pectine dont on a provoqué la transformation en pectate de chaux, par addition d'une solution d'acétate de calcium à 15 0/0. C'est avec cette concentration de 1,2 0/0 que j'ai

obtenu les meilleurs résultats : une quantité moindre ne donne pas un milieu suffisamment ferme, pour y bien observer les progrès de la liquéfaction ; avec une dose plus forte, la gelée devient si compacte, que les microbes ne se développent pas, ou le font avec une extrême lenteur, à cause du pouvoir d'imbibition pour l'eau des corps pectiques.

Ce milieu de culture (acidifié pour les moisissures et alcalinisé pour les bactéries), devait être stérilisé avec les mêmes précautions qui ont été adoptées pour la stérilisation des tiges de lin. Les solutions de pectines chauffées à 120° précipitent mal par l'acétate de chaux, et les pectates de chaux bien denses, chauffées aux mêmes températures, se liquéfient partiellement. Pour éviter ces inconvénients, on a stérilisé à 110° les tubes contenant la solution pectique qui était ensuite précipitée par une solution d'acétate de calcium également stérilisée.

Les gelées de pectate de chaux ainsi obtenues ont été ensemencées avec les espèces suivantes :

Cladosporium herbarum, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *B. coli*, *B. fluorescens liquefaciens*, *B. subtilis* et *B. mesentericus*.

Tous ces organismes ont liquéfié la gelée ; l'action liquéfiante la plus rapide et la plus complète a été observée avec l'*Aspergillus* et le *Penicillium*, parmi les moisissures, et avec le *B. fluorescens* parmi les bactéries, celles-ci donnaient naissance à un léger dégagement gazeux pendant la liquéfaction. Il existe, comme on le sait, toute une série de corps pectiques assez mal définis et souvent difficiles à distinguer les uns des autres, série qui commence par la pectose, corps neutre et insoluble, et finit à l'acide méta-pectique, soluble et nettement acide et qui est le plus stable de tous.

Ce serait celui-ci qui se formerait par l'action microbienne, et Kolb prétend en avoir trouvé de grandes quantités dans les eaux de rouissage. Je ne suis pas parvenu à le caractériser dans les produits de l'action des microbes sur le pectate de chaux.

Le fait de la liquéfaction du pectate insoluble par les micro-organismes est donc prouvé. M. Winogradsky avait obtenu la même liquéfaction, mais beaucoup plus rapide, avec son ferment anaérobie du rouissage.

STATISTIQUE DE L'INSTITUT ANTIRABIQUE DE TUNIS

Par le Dr A. LOIR

L'Institut antirabique de Tunis a été ouvert le 15 juin 1894, il a donc plus de sept années d'existence. Il a été créé pour éviter aux personnes mordues, sur le territoire de la Régence, les inconvénients et les retards d'un voyage en France.

D'un autre côté, de nombreux Arabes des campagnes, surtout les femmes, refusaient de quitter la Régence, tandis qu'elles acceptent de venir à Tunis rechercher les bienfaits de la méthode pasteurienne.

Bien qu'il n'existe aucun document antérieur à la fondation de l'Institut Pasteur, relatant une statistique, la rage a été de tout temps une maladie fréquente et assez répandue en Tunisie. Ce qui en fait foi, c'est le nombre considérable de moyens mis en pratique par les indigènes pour guérir cette maladie. La superstition même attribue, à quelques marabouts, la faculté de prévenir la rage chez les mordus, et à l'eau de certains puits des qualités thérapeutiques à l'égard de cette maladie.

De tout temps, les toubibs (médecins arabes) se sont occupés de remédier à ce fléau et ont eu recours pour le faire aux panacées les plus extraordinaires.

La tête du chien mordeur carbonisée, pulvérisée et absorbée dans du vinaigre est un remède préconisé, ainsi que la fiente de chameau. A Gabès, le remède considéré comme le plus efficace par les indigènes est celui-ci : vingt-trois jours après la morsure, on fait absorber au blessé du bouillon fait avec de la viande d'un agneau d'un an, le poids d'un grain de blé d'une variété de coléoptère vésicant appelé dzermouth. Le malheureux ne tarde pas à uriner du sang dans lequel, au dire des Arabes, on retrouve sept petits vers qui seraient des embryons de chiens engendrés dans le corps humain par le virus. Ceux-ci une fois expulsés, le malade guérit.

Tous ces faits prouvent combien la rage est fréquente en Tunisie où elle se manifeste indifféremment, comme partout, en été et en hiver. Nous n'avons pas remarqué une fréquence plus

grande de la rage furieuse ou de la rage mue dans les différentes saisons.

Sur les 827 personnes soignées à l'Institut du 15 juin 1894 au 15 juin 1901, on trouve 287 Français, dont 88 soldats; 161 Italiens; 30 Maltais; 218 Arabes (hommes); 42 Arabes (femmes); 1 Grec; 6 Espagnols.

On compte 73 morsures à la tête, 468 aux mains, et 286 aux membres.

Les animaux mordeurs ont été : chiens 762, chats 39, chacals 2, ânes 2, chevaux 2, mulet 1, hommes 19.

Cette quantité anormale de personnes contagionnées par des hommes et qui sont venues se faire traiter s'explique par les usages d'une partie de la population tunisienne, les Siciliens, qui vont rendre visite au moribond, le chargent de commissions pour l'autre monde, l'embrassent et peuvent ainsi s'infecter.

Deux personnes ont été prises de la rage pendant le traitement, une autre est morte 10 jours après la fin du traitement. D'après les règles adoptées à l'Institut Pasteur de Paris, on ne doit pas compter ces trois décès dans le calcul de la mortalité; ne doivent y figurer, en effet, que les personnes prises de rage plus de 15 jours après le dernier traitement. Elles sont au nombre de 3.

Un homme est mort 11 mois après avoir subi les inoculations, un autre 3 mois et un troisième 4 mois après le traitement.

Sur les 827 personnes traitées, la mortalité est donc de 0,36 0/0, c'est-à-dire à peu près le chiffre de la mortalité donné par presque toutes les statistiques des différents Instituts Pasteur.

La statistique de ces 7 années nous montre la nécessité de l'application de la loi française qui veut que tout chien mordu, ou simplement roulé, par un chien enragé, soit immédiatement tué. Cette loi n'existe pas en Tunisie : aussi voit-on de véritables épidémies se produire à la suite de la morsure d'un chien enragé. Cet état de choses provient de ce que, au lieu de détruire les chiens mordus, on les met, dit-on, en observation. Or, le propriétaire de l'animal ne s'aperçoit jamais que son chien mis en observation offre des symptômes de rage. Le 2 décembre 1899, deux perfonnes mordues par un chien viennent de Kairouan pour se saire traiter. L'animal atteint de rage a mordu un autre chien. Celui-ci est mis en observation, disent ces personnes.

Le 21 janvier 1900 arrivent à l'Institut 2 nouveaux malades mordus par le second chien, en observation.

Le 6 décembre une autre personne se présente à l'Institut. Elle a été mordue par un chien qui en a mordu cinq autres qui sont aussi mis en observation. Enfin, le 17 janvier 3 personnes mordues par un de ces chiens en observation viennent demander les inoculations antirabiques. Voilà plusieurs personnes qui auraient été à l'abri de la contamination, si la loi qui veut que tout chien mordu par un chien enragé soit immédiatement abattu était en vigueur.

Le propriétaire d'un chien refuse toujours de reconnaître celui-ci pour suspect, et alors même qu'apparaissent des signes pouvant faire présumer l'hydrophobie, il ne veut pas les voir. Tout dernièrement nous avons été témoin du fait suivant. Un officier possédait deux chiens, qui ayant été roulés par un chien enragé, étaient en observation depuis un mois. Un jour, sur le point de sortir, il appela un de ses chiens à plusieurs reprises. Celui-ci n'obéit pas à l'appel de son maître qui, pour le punir, le cingla d'un léger coup de fouet. A son retour, au lieu de japper et d'accourir comme d'habitude, le chien restait immobile et abattu, et comme son maître s'approchait de lui pour le caresser, il le mordit à la main. Durant la nuit, éveillé par un bruit, sourd, il trouva le chien qui était tombé du fauteuil sur lequel il dormait habituellement; en le relevant, il fut mordu à l'autre main; le lendemain matin le chien fut trouvé mort, et ce ne fut que lorsque les mêmes symptômes se manifestèrent, 10 jours après, sur le second chien, et après l'avoir fait examiner par un vétérinaire qui reconnut la rage, qu'il vint se faire traiter à l'Institut Pasteur.

La petite épidémie suivante, survenue à Sousse, montrera combien les mesures sanitaires sont efficaces pour arrêter l'évolution de la rage.

Il a été traité à Tunis, venant de Sousse, 3 personnes en 1894, 4 en 1895, 2 en 1896, 16 en 1897 et enfin 41 en 1898. Le 9 février 1898 arrivent à Tunis 11 personnes qui ont été mordues à Sousse le 6 février par un chien enragé. Ce chien a mordu plusieurs autres chiens qui ont été tués, mais l'un d'eux, après être resté en observation pendant trois mois, est rendu à son maître et reprend sa place dans la maison.

Le 31 août, c'est-à-dire sept mois après qu'il avait été mordu, ce chien mord un enfant de neuf ans, fils de son maître; on le met en observation, la nuit il casse sa chaîne et mord dans la journée du 1er septembre 5 personnes, dont 4 enfants. Enfin, on le reconnaît atteint de la rage. Voilà 6 personnes obligées de subir le traitement arabique. Je signale cette épidémie à l'administration : on prend des mesures et les mordus diminuent, puisque 6 personnes seulement viennent se faire traiter en 1899, 2 en 1900 et 7 en 1901. Souvent on signale la mort d'indigènes qui n'ont pas voulu venir se faire traiter ; d'autres viennent pendant un jour ou deux, puis ne veulent plus continuer à subir les inoculations parce que, fidèles aux traditions dont nous avons parlé plus haut, ils ont été se plonger dans l'eau d'un puits célèbre par ses guérisons. On ne tarde pas à apprendre la mort de ces malheureux quelque temps après.

Deux musulmans des environs de Tunis vinrent se faire traiter en 1898. Ils subirent le traitement pendant 2 jours consécutifs, puis cessèrent de se présenter à l'Institut pour les inoculations. Je les fis avertir que le traitement n'était pas achevé; mais ils refusèrent de revenir s'y soumettre. L'un et l'autre moururent de la rage à 15 jours d'intervalle, 1 mois 1/2 après.

Les premières années, nous appliquions le traitement classique de Pasteur. Depuis 1896, nous faisons usage de la méthode préconisée par M. Calmette, nous conservons les moelles des lapins dans la glycérine ; on peut, grâce à cette méthode, faire seulement trois séries de lapins par mois. Nous n'avons pas constaté de différence dans les résultats obtenus par l'application de ce traitement.

Nous pouvons ajouter que pendant ces 7 années nous n'avons pas eu un seul abcès sur les personnes inoculées.

En faisant des recherches relatives à l'action de la glycérine neutre stérilisée sur le virus fixe de la rage et sur ce même virus à ses différents degrés d'atténuation, nous avons constaté que les cerveaux rabiques, conservés entiers dans 20 grammes de glycérine, à 30° et à une température de 10 à 15°, ne s'atténuent pas d'une manière progressive, comme on pourrait le croire. La virulence disparaît subitement, au bout d'une période qui n'a jamais dépassé 2 mois 1/2 dans nos expériences.

Avec des émulsions de cerveaux qui avaient ainsi perdu leur virulence ayant été conservés de 4 mois à 2 mois 1/2 dans la glycérine et ne donnaient plus la rage par trépanation, nous avons inoculé, sous la peau, tous les 8 jours, plusieurs séries de lapins chaque fois, avec 4 c. c. d'une émulsion épaisse. Les inoculations ont été faites pendant 3 mois, sans amener aucun accident, puis ces lapins ont été trépanés avec du virus fixe et sont morts avec un retard moyen de 48 heures sur les témoins.

L'INSTITUT ANTIRABIQUE DE LA VILLE DE BORDEAUX

PAR LE D[r] G. FERRÉ.

Professeur à la faculté de médecine de Bordeaux.

I

L'institut antirabique de la ville de Bordeaux a été fondé par la municipalité bordelaise en 1900 : cette dernière pourvoit à son entretien avec subvention du département de la Gironde. Il fonctionne sous ma direction avec l'aide de M. le D[r] Buard.

Dès le 1[er] mai 1900, les inoculations antirabiques auraient pu y être pratiquées, mais la première personne à traiter ne s'est présentée que le 19 mai. Le nombre des personnes traitées pendant la première année du fonctionnement, c'est-à-dire du 19 mai 1900 au 18 mai 1901, a été exactement de 100.

Je grouperai les résultats obtenus dans un tableau semblable à celui que publie pérodiquement l'Institut Pasteur.

Voici ce tableau :

	TÊTE			MAINS			MEMBRES			TOTAUX		
	Traités.	Morts.	Mortalité.	Traités.	Morts.	Mortalité.	Traités.	Morts.	Mortalité.	Traités.	Morts.	Mortalité.
Tableau A.......	1	0	0	15	0	0	12	0	0	28	0	0
Tableau B.......	4	0	0	16	0	0	5	0	0	25	0	0
Tableau C.......	3	0	0	30	0	0	14	0	0	47	0	0
	8	0	0	61	0	0	31	0	0	100	0	0

La mortalité est de 0.

II

Les personnes mordues sont venues de la région du Sud-Ouest.

La Gironde en a fourni 45; le Lot-et-Garonne, 14; la Charente, 12; la Charente-Inférieure, 3; les Basses-Pyrénées, 10; les Landes, 5; le Gers, 6; la Dordogne, 2; le Lot, 2; le Tarn-et-Garonne, 1.

Le traitement a été commencé : 1 jour après la morsure, 6 fois; 2 jours après, 9 fois; 3 jours après, 15 fois; 4 jours après, 8 fois; 5 jours après, 25 fois; 6 jours après, 5 fois; 7 jours et plus, 27 fois; 10 jours et plus, 7 fois; plus de 15 jours après, 8 fois.

Parmi les animaux mordeurs nous comptons 88 chiens, 10 chats, 1 porc et 1 lapin.

Le traitement est absolument identique à celui qui se pratique à l'Institut Pasteur.

Je signalerai une innovation qui offre des avantages réels : les chiens mordeurs, les chiens suspects sont amenés par la police dans les chenils de l'Institut antirabique où ils sont mis en surveillance pendant le laps de temps voulu.

Je suis heureux, en terminant, de rendre hommage à la bienveillance de l'Institut Pasteur qui a recommandé, toutes les fois qu'il a pu le faire, aux personnes mordues de notre région de venir se faire traiter à Bordeaux.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

16me ANNÉE 25 JUIN 1902 N° 6

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

IMMUNISATION ANTIRABIQUE
AU MOYEN DES INJECTIONS INTRAVASCULAIRES
DU VIRUS RABIQUE

Par le Dr V. KRASMITSKI

Travail du laboratoire de M. le professeur Wyssokowicz, de l'Institut bactériologique à Kiew.

Parmi les diverses modifications auxquelles a été soumis le traitement pastorien de la rage, la méthode de dilution de M. Högyes mérite une attention particulière. M. Högyes prend pour point de départ le fait que la dessiccation, en diminuant la virulence du virus rabique, ne change pas sa qualité, mais seulement sa quantité.

En effet, le lapin inoculé par du virus rabique fixe desséché succombe à la rage, après une période d'incubation dont la durée dépasse la durée normale; cependant sa substance bulbaire, inoculée au lapin suivant, lui donne la maladie avec la durée d'incubation normale.

Cette idée que le principe virulent varie en quantité et non en qualité, dans la substance nerveuse desséchée, a conduit M. Högyes à étudier la virulence de diverses dilutions du virus non desséché.

Il est arrivé aux résultats suivants :

La dilution de 1/6,000-10,000 correspond à la dessiccation de 14-8 jours, le virus ainsi dilué n'étant plus virulent.

La dilution de 1/500 ne tue pas tous les lapins et la durée d'incubation est très longue.

La dilution de 1/300-250 présente déjà une virulence considérable.

Les nombreuses (70) expériences faites ensuite sur les chiens ont fait voir à M. Högyes qu'au moyen de ces dilutions, on peut protéger les animaux contre tout mode d'inoculation du virus rabique, même du virus fixe. Cependant il faut distinguer l'inoculation intracranienne (ou intraoculaire) de l'infection sous-cutanée; tandis que dans le premier cas les vaccinations ne sont actives que faites avant l'introduction du virus, dans le deuxième on a des résultats positifs en faisant les vaccinations avant et après l'infection. Ce dernier fait a été mis en évidence par une expérience dans laquelle 8 chiens mordus par un chien enragé, et traités ensuite par les dilutions de M. Hogyes, survécurent, tandis que parmi les 8 chiens de contrôle, 5 ont contracté la rage.

Convaincu de l'innocuité et de l'efficacité de sa méthode, M. Högyes a fait vacciner le personnel de l'Institut de Buda-Pest et ensuite traiter les mordus, en employant les dilutions de 1/10,000 jusqu'aux dilutions de 1/100, cette série étant répétée 3-7 fois suivant la gravité du cas.

En même temps, dans le laboratoire de M. Pasteur de même que dans les autres instituts antirabiques, on a cherché une méthode de traitement plus intensive, afin d'éviter les rares insuccès qui suivaient de temps en temps le traitement employé jusqu'alors. D'après les données statistiques, fournies pendant un grand nombre d'années par les différents instituts antirabiques, on constate que 1,50/0 des personnes mordues ont contracté la rage malgré le traitement. Si on déduit de ce chiffre les cas où la maladie s'est déclarée pendant le traitement ou dans les 15 jours qui ont suivi la dernière injection (délai regardé comme nécessaire pour le développement de l'immunité), le pourcentage diminue, il tombe à 0,7-0,8 0/0.

Ces insuccès — mettant à part les cas où l'immunité n'apparaît pas en vertu de particularités individuelles — trouvent leur explication dans la lenteur avec laquelle l'état réfractaire se développe dans l'organisme; il faut au moins 20 jours de traitement pour que l'immunité puisse apparaître; plus de 15 jours sont nécessaires pour que l'effet des inoculations successives se produise. Si, avant ce terme, le virus rabique atteint

le système nerveux central, la vaccination restera sans nul effet.

La question est donc d'accélérer le processus de l'immunisation. Il semble démontré que le virus rabique se propage, du point d'inoculation (morsure faite par un animal enragé) jusqu'aux centres nerveux, en suivant les voies nerveuses (ce qui nous explique la variabilité et quelquefois la longueur des périodes d'incubation); tandis que les substances immunisantes introduites pendant les vaccinations dans l'organisme s'y propagent par le sang.

Injectées dans le tissu cellulaire sous-cutané, elles y restent pendant 24 à 48 heures, — comme l'a démontré M. Kraiouchkine — avant de passer dans le système lymphatique, interposé entre le point d'inoculation et le sang. Tout naturellement, dans le but d'accélérer le procès d'immunisation, on a eu depuis longtemps l'idée d'injecter les substances immunisantes directement dans le sang. Mais avant de le faire, deux questions doivent être résolues : premièrement, celle de l'innocuité des injections intravasculaires; en second lieu, celle de leur efficacité. M. Helmann, le premier, fit voir que si l'on injecte dans le tissu sous-cutané, même de grandes quantités du virus fixe, les animaux en expérience peuvent échapper à la maladie, à la condition que l'inoculation soit faite à l'abri des filets nerveux.

Le même savant ainsi que d'autres expérimentateurs ont injecté de grandes quantités d'émulsions épaisses et virulentes dans la cavité péritonéale sans rendre les animaux malades. Le fait est facile à comprendre puisque le virus rabique ne peut s'implanter que sur le tissu nerveux.

L'introduction du virus dans le sang est-elle inoffensive ?

M. Pasteur, en expérimentant sur les chiens, a constaté que l'injection du virus rabique (salive des animaux enragés) dans le sang, leur donne la rage tout aussi infailliblement que l'inoculation intracranienne. Plus tard, il a constaté que le virus introduit dans le sang, en très petites quantités, n'occasionne parfois aucune maladie, mais n'exerce également aucune action immunisante[1].

1. De quelques expériences sur les moutons, M. Galtier conclut que les injections intravasculaires du virus rabique (il opérait aussi avec la salive des animaux enragés) immunisent les herbivores au lieu de leur donner la rage. Cet expérimentateur éprouvait les animaux immunisés par l'inoculation de bave rabique, sous la peau ou dans la peau. Ce procédé ne donnant pas sûrement la rage, ces conclusions ne pouvaient être acceptées définitivement.

La question a été élucidée par MM. Roux et Nocard. Ces savants ont eu recours aux injections intravasculaires de la substance cérébrale du lapin, ayant succombé soit au virus rabique fixe, soit au virus des rues. Pour s'assurer de la valeur de l'immunité acquise, ils éprouvaient les animaux vaccinés par inoculation intraoculaire, inoculation qui est toujours mortelle. Dans leurs expériences, MM. Roux et Nocard ont opéré sur 10 moutons, 3 chèvres et 1 bouc, en injectant dans les veines de 0,5 à 5 c. c. d'émulsion de cerveau de chiens enragés ou de lapins de passage; après des délais variables ils les inoculèrent avec du virus rabique des rues. Tous survécurent. Mais quand ils ont éprouvé leurs animaux avec du virus fixe, 7 sur 11 contractèrent la rage, 4 seulement se sont montrés immunisés.

Dans la deuxième série d'expériences, MM. Roux et Nocard ont injecté dans la veine de 3 vaches et de 3 veaux, en une fois, 10-20 gouttes d'émulsion du cerveau de lapin de passage; 7 semaines après ils ont fait à ces animaux des inoculations intraoculaires du virus des rues; tous contractèrent la rage après une période d'incubation quelque peu prolongée.

Enfin les deux savants ont pratiqué des injections intraveineuses aux moutons et aux brebis, après les avoir soumis préalablement à l'infection intraoculaire par le virus rabique des rues, et sont arrivés aux conclusions suivantes :

1) Une vaccination est faite 2 jours après l'infection, tous les moutons (au nombre de 3) contractent la rage.

2) Une vaccination (12 c. c. d'émulsion) est faite 2 heures après l'infection, sur 3 moutons 1 résiste à la maladie.

3) Deux vaccinations sont faites à intervalle de 2 jours, les résultats varient suivant la durée de temps écoulé entre le moment de l'infection et la première vaccination. Ainsi, lorsque la première vaccination avait eu lieu 24 heures après l'injection, 1 seul mouton succomba sur 4; tous les moutons prirent la rage lorsque la première inoculation vaccinale était faite 2 à 3 jours après l'inoculation La quantité d'émulsion injectée variait de 0,5 à 3 c. c.

Ainsi, MM. Roux et Nocard ont confirmé l'opinion de M. Galtier, sur la possibilité de rendre les animaux réfractaires à la rage, au moyen des injections intravasculaires; ils ont montré, en outre, que cet état réfractaire se développe relativement vite,

et peut protéger l'animal contre l'injection la plus dangereuse, l'injection intraoculaire, à la seule condition que la première vaccination soit faite bientôt (24 heures) après l'injection.

MM. Roux et Nocard ajoutent qu'on peut introduire impunément, même de grandes quantités de virus dans le sang du chien. Néanmoins ils ne parlent de l'innocuité des injections intravasculaires et de leur efficacité, au point de vue du développement de l'immunité, que pour les herbivores, qui pour eux se comportent différemment des autres animaux, chien et lapin par exemple.

M. Helmann, qui traite la même question, croit que les injections intraveineuses peuvent donner la rage, si le virus rabique passe du sang dans le système nerveux central. Ce passage à travers les parois vasculaires, d'après M. Helmann, est favorisé ou empêché suivant la structure des capillaires et leur épaisseur plus ou moins grande. Ce qui expliquerait le fait que les lapins et les jeunes chiens succombent toujours aux injections intravasculaires; les chiens adultes résistent quelquefois, et les chèvres, les moutons, les vaches, animaux de plus grande taille, sont beaucoup plus résistants. Parmi les savants russes qui ont travaillé sur la question dont nous parlons en ce moment, c'est M. Protopopoff qui est arrivé aux résultats les plus intéressants.

M. Protopopoff a voulu donner au chien une immunité assez considérable pour que cet animal puisse résister ensuite à l'inoculation intracranienne du virus fixe. Pour atteindre cet état, au moyen des injections sous-cutanées, il faudrait en faire un nombre très grand. C'est pourquoi M. Protopopoff a eu recours aux injections intravasculaires de l'émulsion ordinaire de cerveau du lapin de passage. Il l'introduisait dans la veine fémorale.

Dans la première série d'expériences, M. Protopopoff opérait avec les cerveaux desséchés : 3 vaccinations avec le virus âgé de 9-5 et de 2 jours ont donné des résultats négatifs, de même que 2 vaccinations avec le virus âgé de 6 et 2 jours ; mais 3 injections de 6-3 et de 1 jour, ou bien 2 du vaccin de 5 et de 1 jour, ont été suivies de résultats positifs : les chiens inoculés sous la dure-mère avec le virus fixe, 15 jours après la vaccination, se sont montrés réfractaires à la rage.

Dans la deuxième série d'expériences, M. Protopopoff prépa-

rait ses vaccins antirabiques de la manière suivante : les fragments de la moelle épinière des lapins de passage, soumis préalablement à la dessiccation pendant 5 jours et 1 jour, ont été conservés dans du bouillon glycériné (30 glycérine p. 100 de bouillon) jusqu'au moment où ils n'étaient plus virulents; émulsionnés ensuite, ils sont injectés aux 3 chiens dans la veine fémorale; 8 jours après, on fait à ces chiens une inoculation intracranienne du virus rabique des rues : 1 seul sur 3 prend la rage. Donc, les moelles rabiques desséchées pendant 5 jours et 1 jour, de même que les moelles rendues non virulentes par la conservation dans du bouillon glycériné se sont montrées, entre les mains de M. Protopopoff, des vaccins efficaces.

Dans le même ordre d'idées, M. Moncet communiqua, il y a 2 ans, un cas intéressant : 3 vaches avaient été mordues par un chien enragé; ce chien étant tué, avec son cerveau M. Moncet prépara une émulsion qu'il injecta dans la veine jugulaire des vaches mordues, à la dose de 5 c. c. pour chaque vache; toutes les trois échappèrent à la rage.

Voilà toute une série d'opinions contradictoires sur la question de l'innocuité et de l'efficacité, au point de vue de l'immunisation, des injections intravasculaires du virus rabique.

Ce problème n'étant pas encore tranché et présentant un grand intérêt théorique et pratique, j'ai eu l'idée de faire une série d'expériences dans le but de contribuer à sa résolution.

Déjà, *a priori*, on peut penser que l'introduction, dans le système sanguin, du virus rabique émulsionné, produira une infection, s'il y a formation d'une embolie, dans un capillaire du tissu nerveux, par les particules solides suspendues dans ladite émulsion. C'est pourquoi, pour éviter cet inconvénient, on aura soin, tout d'abord, de préparer une émulsion aussi fine et aussi homogène que possible et de la diluer suffisamment pour qu'elle puisse circuler librement dans les capillaires les plus fins. Alors, on pourra espérer que les particules du virus rabique, circulant librement, et étant séparées du tissu nerveux par les parois endothéliales des vaisseaux sanguins, seront inoffensives.

En second lieu, on pourra attendre qu'elles aient aussi une action immunisante, car distribuées par le sang dans les différents organes, elles seront résorbées par les éléments phagocy-

taires, et de la sorte seront réalisées les conditions dans lesquelles apparaîtra l'état réfractaire.

Pour prouver ces deux thèses j'ai conduit mes expériences de la façon suivante :

L'émulsion est préparée avec les corps quadrijumeaux du lapin de passage (virus fixe) et la solution physiologique de NaCl, dans le rapport d'une partie de substance nerveuse pour trente de liquide ; elle est tellement fine et homogène qu'elle traverse facilement trois réseaux métalliques, superposés, excessivement fins (le diamètre des mailles du réseau est de 0%,2); elle est ensuite diluée encore une fois avec la solution physiologique, dans le rapport de 1 p. à 10-15. Ainsi préparée, cette émulsion est à peu près transparente, dans les couches peu épaisses; elle est en même temps virulente en injections intracraniennes.

Avec cette émulsion j'ai fait des vaccinations sur les lapins (veine auriculaire externe) et sur les chiens (veine saphène interne du membre postérieur). Si, pendant les vaccinations, on a scrupuleusement tenu compte de toutes les précautions exigées : chauffage de l'émulsion à 37°, injection lente, rigoureuse propreté de la seringue stérilisée, le lapin et le chien supportent l'injection parfaitement bien. Si, au contraire, quelqu'une de ces précautions a été omise, l'embolie se forme et il m'est arrivé de voir les lapins mourir sur place.

Dans la première série d'expériences, j'ai cherché à obtenir une immunité stable en injectant de faibles quantités de l'émulsion virulente diluée. Ainsi conçues, mes expériences m'ont donné les résultats suivants :

a) On introduit, une fois, dans la veine de 9 lapins de 1 à 3 et 5 c. c. d'émulsion du virus fixe, passée sur toile métallique, et diluée. Ensuite, après des délais variant de 3 à 16 jours, ces lapins sont inoculés sous la dure-mère, avec du virus fixe : 8 prennent la rage, 1 échappe à la maladie. (Tableaux I et II.)

b) On introduit 1 c. c. d'émulsion de virus fixe, filtrée et diluée, dans la veine de 6 lapins, et on répète l'injection du 5e au 9e jour. Puis, de 8 à 21 jours après la première vaccination, on leur inocule sous la dure-mère de l'émulsion épaisse du virus fixe : 2 de ces lapins, l'un qui a été éprouvé 8 jours après et l'autre 21 jours après la première injection, contractent la rage en même temps que les lapins de contrôle; un troi-

sième succombe après une période d'incubation prolongée de 2 jours; 3 restent sains. (Tableau I.)

TABLEAU I

ESSAIS D'IMMUNISATION DES LAPINS, AU MOYEN D'INJECTIONS INTRAVEINEUSES, SUIVIES D'INFECTION INTRACRANIENNE PAR L'ÉMULSION ÉPAISSE DU VIRUS FIXE.

Nos d'animaux en expérience.	NOMBRE d'injections	QUANTITÉ d'émulsion injectée.	MODE d'infection.	TEMPS écoulé entre les injections et l'infection.	RÉSULTATS OBTENUS
1	1	1 c. c.	Inoculation intracranienne d'émulsion épaisse du virus fixe.	Injection faite 3 jours avant l'infection.	Prend la rage et meurt en même temps que les lapins de contrôle (lapins de passage).
2	1	1 c. c.	Idem.	Inject. 9 jours avant l'infection.	Idem.
3	1	1 c. c.	—	Inject. 14 jours av. l'infection.	—
4	1	1 c. c.	—	Idem.	—
5	1	2 c. c.	—	Inject. 16 jours av. l'infection.	Prend la rage et meurt en même temps que les lapins de contrôle.
6	1	3 c. c. 5	—	Inject. 8 jours avant l'infection.	Idem.
7	1	3 c. c. 5	—	Inject. 18 jours av. l'infection.	Prend la rage et meurt en même temps que les lapins de contrôle (lapins de passage).
8	2	Par 1 c. c. 5	—	Inj. faites 8 et 3 j. avant l'infect.	Idem.
9	2	Par 1 c. c.	—	Inj. faites 21 et 5 j. avant l'infect.	—
10	2	Par 1 c. c.	—	Inj. faites 12 et 7 j. avant l'infect.	Période d'incubation de 7 jours; meurt après 13 jours.
11	2	Par 1 c. c.	—	Inj. faites 21 et 8 j. avant l'infect.	Résiste à la rage.
12	2	Par 0 c. c. 9	—	Inj. faites 18 et 5 j. avant l'infect.	Idem.
13	2	Par 1 c. c.	—	Inj. faites 13 et 5 j. avant l'infect.	—

Les résultats sont peu satisfaisants dans l'expérience *a*, 1 lapin sur 9 est rendu réfractaire ; dans l'expérience *b*, 3 animaux résistent. Mais il y a à tenir compte de ce que cette infection diffère de celle qui a lieu dans les conditions naturelles : l'animal mordeur introduit dans la morsure le virus (virus des rues) très dilué avec la salive, tandis que dans les expériences précédentes, le lapin est infecté par l'émulsion épaisse du virus fixe. C'est pourquoi dans l'expérience suivante j'ai inoculé mes lapins sous la dure-mère (infection toujours mortelle) avec de l'émulsion filtrée et diluée, et alors les vaccinations intraveineuses ont donné des résultats plus encourageants. Voilà cette expérience en détail :

c) On introduit dans le sang de 10 lapins, 1-1,5-3 c. c. d'émulsion ; 2 fois l'injection est répétée de 3 à 9 jours après. Puis, de 5 à 21 jours après la première vaccination, on leur injecte sous la dure-mère de l'émulsion filtrée et diluée, mais toujours virulente, du virus fixe. Un seul prend la maladie en même temps que les lapins de contrôle, c'est le lapin qui a été trépané 7 jours après la première injection ; 2 autres lapins deviennent enragés après une période d'incubation prolongée de 2 jours ; 7 restent sains ; parmi ces derniers se trouve un lapin qui a reçu une inoculation intracranienne du virus fixe 5 et 2 jours après les vaccinations. (Tableau II.)

L'examen détaillé des résultats nous montre que chez les lapins qui ont reçu deux injections intraveineuses de virus fixe, l'état réfractaire apparaît 15 jours après la première injection, et qu'ils résistent même au virus fixe inoculé sous la dure-mère.

On arrive à rendre les lapins réfractaires au virus de la rage des rues en leur injectant l'émulsion de virus fixe dans les veines, et cela dans un délai plus court, ainsi que le démontrent les expériences suivantes :

On introduit une fois dans la veine de 4 lapins de 0,5 à 3 c. c. d'émulsion filtrée du virus fixe ; après 16-45 jours, les lapins sont trépanés et inoculés sous la dure-mère avec du virus rabique des rues. Tous contractent la rage. La quantité employée d'émulsion a été trop faible. A deux lapins, au lieu de 3 c. c., injectons, toujours dans la veine, 5 c. c. d'émulsion du virus fixe, et éprouvons-les avec du virus des rues, 10-12 jours après l'injection (au lieu de 16-45 comme dans l'expérience précédente) ils résistent à l'infection. De même, à 4 lapins faisons 2 injec-

TABLEAU II

ESSAIS D'IMMUNISATION DES LAPINS AU MOYEN D'INJECTIONS INTRAVEINEUSES, SUIVIES D'INFECTION INTRACRANIENNE, PAR L'ÉMULSION FILTRÉE ET DILUÉE DU VIRUS FIXE.

Nos d'animaux en expérience.	NOMBRE d'injections.	QUANTITÉS d'émulsion injectée.	MODE d'infection.	TEMPS écoulé entre les injections et l'infection.	RÉSULTATS OBTENUS
1	2	Par 1 c. c.	Inoculation intracranienne d'émulsion filtrée et diluée du virus fixe.	Injections faites 14 et 6 jours avant l'infection.	Période d'incubation de 7 jours; meurt après 11 jours.
2	1	2 c. c.	Idem.	Inj. 14 j. av. l'inf.	Résiste à la rage.
3	2	1 c. c. et 1 cc, 5	—	Inj. faites 20 et 6 j. avant l'infect.	Idem.
4 poids de 1130 gr.	1	2 c. c.	—	Inj. 16 j. avant l'infection.	Prend la rage et meurt en même temps que les lapins de contrôle (lap. de passage).
5 p. de 950 gr.	2	Par 1 c. c.	—	Inj. faites 16 et 7 j. avant l'infection.	Résiste à la rage.
6 p. de 1000 gr.	2	2 c. c. et 1 cc, 3	—	Inj. faites 21 et 12 jours avant l'infection.	Idem.
7	2	Par 3 c. c.	—	Inj. faites 15 et 7 jours av. l'inf.	—
8	2	Par 1 c. c	—	Inj. faites 14 et 5 jours avant l'infection.	Mort. Période d'incubation prolongée de 36 h. en comparaison avec les lapins de contrôle (lap. de passage).
9	2	Par 3 c. c.	—	Inj. faites 11 et 4 jours av. l'inf.	Résiste à la rage.
10	2	Par 3 c. c.	—	Inj. faites 5 et 2 jours avant l'infection.	Inoculé encore la deuxième fois sous la dure-mère du virus fixe, résiste à la rage.
11	2	Par 3 c. c.	—	Inj. faites 7 et 4 jours avant l'infection.	Prend la rage en même temps que les lapins de contrôle (lap de passage).
12	2	Par 3 c. c.	—	Inj. faites 14 et 11 jours av. l'inf.	Résiste à la rage.
13	2	Par 3 c. c.	—	N'a pas été inoculé, car le 7e jour après la 2e injection il succombe à la rage.	

tions intraveineuses de faibles quantités d'émulsion du virus fixe, le premier reçoit 0, 5 c. c., le second 1 c. c., le troisième 1,5 c. c., le quatrième 3 c. c. à chaque injection ; après 10 jours inoculons-les sous la dure-mère, avec du virus des rues, ils résistent à la rage à l'exception du premier qui n'a reçu que 2 fois 0, 5 c. c. d'émulsion (Tableau III). Toute cette série d'expériences nous prouve l'efficacité des injections intraveineuses d'émulsion diluée.

Pour la comparer avec l'efficacité des injections intrapéritonéales et sous-cutanées, j'ai fait les expériences suivantes :

J'ai introduit dans le péritoine de 3 lapins 5-8 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe et dans le péritoine d'un quatrième lapin 2 fois 5 c. c. : 7-17 jours après, je les inocule sous la dure-mère avec du virus fixe; 3 résistent à la rage, un seul succombe, celui qui a été vacciné une seule fois et trépané 10 jours après la vaccination.

Les injections intrapéritonéales se montrent donc efficaces; mais il faut tenir compte de la quantité d'émulsion employée, quantité beaucoup plus grande que dans le cas des injections intravasculaires.

La même observation est à faire par rapport aux injections sous-cutanées. Sur 7 lapins, qui ont reçu en 2 fois 8 et 20 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe, et qui, 12-25 jours après, ont été inoculés sous la dure-mère, avec du virus rabique des rues ou bien avec du virus fixe, un seul succombe, celui qui a reçu seulement 8 c. c. d'émulsion. Mais si, au lieu de l'émulsion épaisse, on injecte sous la peau l'émulsion diluée, utilisée pour les injections intraveineuses, on ne donne pas l'immunité. Deux lapins, qui avaient reçu dans le tissu sous-cutané 2 fois 5 c. c. de cette solution diluée, ont été éprouvés par inoculation sub-durale, ils ont succombé en même temps que les témoins. (Tableau IV.)

Donc, en tenant compte de la quantité d'émulsion employée pour les vaccinations, nous pouvons conclure que les injections intraveineuses sont plus efficaces que les injections sous-cutanées et intrapéritonéales.

Ceci étant démontré par rapport aux lapins, j'ai voulu voir l'effet immunisant des injections intravasculaires sur les chiens.

TABLEAU III

ESSAIS D'IMMUNISATION DES LAPINS, AU MOYEN D'INJECTIONS INTRAVEINEUSES SUIVIES D'INFECTION INTRACRANIENNE PAR LE VIRUS DES RUES (A L'EXCEPTION DES 2 PREMIÈRES EXPÉRIENCES OU L'INFECTION A PRÉCÉDÉ LES INJECTIONS).

Nos des animaux en expérience (lapins).	NOMBRE d'injections.	QUANTITÉS d'émuls. inject. (filtr. et diluée du virus fixe).	MODE d'infection.	DÉLAIS entre les injections et l'infection.	RÉSULTATS obtenus.	
1	1	0 c.c. 8	Inoculation intracranienne du virus rabique des rues.	Injection faite 1 heure après l'infection.	Mort. Période d'incubation de 15 jours.	Le lapin de contrôle est mort après la période d'incubat. de 18 j
2	2	Par 1 c. c.	Idem.	Injections faites 1 heure et 24 heures après l'infect.	Mort. Période d'incubation de 17 jours.	Idem.
3	1	5 c. c.	—	Injection 12 jours avant l'infection.	Résiste à la rage.	Le cobaye de contrôle contracte la rage furieuse 9 jours après l'infection.
4	1	0 c.c. 5	—	Injection 16 jours avant l'infection.	Mort. Période d'incubation de 16 jours.	
5	2	1 c.c. et 0 c.c. 5	—	Injections faites 16 et 7 j. avant l'infect.	Mort. Période d'incubat. de 16 j.	
6	1	1 c. c.	—	Injection 16 jours avant l'infection.	Mort. Période d'incubat. de 16 j.	
7	2	Par 1 c. c.	—	Injections faites 21 et 10 j. avant l'infect.	Résiste à la rage.	
8	1	3 c. c.	—	Injection 15 jours avant l'infection.	Mort. Période d'incubat. de 15 j.	
9	2	Par 3 c. c.	—	Injections faites 12 et 4 j. avant l'infection.	Résiste à la rage.	Le lapin de contrôle succombe après la période d'incub. de 15 j.
10	1	5 c. c.	—	Injection 10 jours avant l'infection.	Idem.	Idem.
11	2	2 c. c. et 1 c. c.	—	Injections faites 10 et 3 j. avant l'infect.	—	—

Dans ce but j'ai vacciné 3 chiens. Le premier a reçu 3 injections intraveineuses de 8 c. c., 5 c. c. et 10 c. c. d'émulsion filtrée et diluée du virus fixe; le second, 2 injections de 10 c. c. et de 6 c. c. ; le troisième aussi 2 injections de 10 c. c. ; ces vaccinations ont été faites dans le délai de 7-9 jours. Le premier a été conservé sans être éprouvé, afin de s'assurer de l'innocuité des injections intravasculaires. Aux deux autres, 16 et 23 jours après la première vaccination, on a inoculé, dans la chambre antérieure de l'œil, du virus rabique des rues. Tous les trois résistèrent à la rage ; tandis que le lapin de contrôle, inoculé en même temps et de la même manière, finit par prendre la rage. (Tableau VI.)

Par les expériences que je viens de rapporter, j'ai cru avoir démontré l'innocuité et l'efficacité, au point de vue de l'immunisation antirabique, des injections intravasculaires de l'émulsion du virus fixe, filtrée et diluée, tant par rapport aux lapins que par rapport aux chiens.

Dans ces expériences, j'ai cherché à montrer l'action préventive des injections faites avant l'infection intracranienne ou intraoculaire.

Dans les recherches consécutives, c'est l'effet curatif des injections intraveineuses que j'ai tenu à élucider et je suis arrivé aux résultats suivants :

Vingt lapins sont inoculés sous la dure-mère avec du virus rabique des rues. Le même jour, ou bien le jour suivant, on leur fait une injection intraveineuse de l'émulsion filtrée et diluée du virus fixe; on a répété ces injections pendant 3 à 6 jours en leur introduisant en tout 37 c. c. d'émulsion au maximum. L'émulsion qui a servi pour l'infection intracranienne était virulente, quoique considérablement diluée; les lapins de contrôle non injectés, de même que les lapins de contrôle injectés dans le tissu sous-cutané, succombèrent tous en même temps à la rage. Tandis que sur 20 lapins traités par les injections intraveineuses, 4 résistèrent. (Tableaux VII, VIII, IX.)

Ce rapport de 4 sauvés sur 20 infectés est sûrement peu considérable; néanmoins il est encourageant vu l'impossibilité absolue, admise jusqu'à présent, de sauver les lapins inoculés de virus rabique sous la dure-mère.

TABLEAU IV

ESSAIS D'IMMUNISATION DES LAPINS, AU MOYEN D'INJECTIONS SOUS-CUTANÉES ET INTRAPÉRITONÉALES, SUIVIES D'INFECTION INTRACRANIENNE PAR LE VIRUS FIXE OU LE VIRUS DES RUES.

Nos des animaux en expérience (lapins).	NOMBRE d'injections.	MODE D'INJECTION Quantité et qualité d'émulsion injectée.	MODE d'infection.	DÉLAIS entre l'injection et l'infection.	RÉSULTATS obtenus.
1	1	5 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe injectés dans le péritoine.	Inoculation intracranienne de l'émulsion diluée du virus fixe.	Inj. 7 jours avant l'infection.	Résiste à la rage.
2	1	Idem.	Idem.	Inj. 10 jours avant l'infection.	Prend la rage et meurt en même temps que les lapins de contrôle.
3	2	Par 5 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe injectés dans le péritoine.	—	Inject. faites 17 et 9 jours avant l'infection.	Résiste à la rage.
4	1	8 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe dans le péritoine.	—	Inj. 14 jours avant l'infection.	Idem.
5	2	Par 5 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injections sous-cutanées.	—	Inject. faites 24 et 16 jours avant l'infection.	—
6	2	Par 10 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injections sous-cutatées.	—	Inject. faites 17 et 9 jours avant l'infection.	—
7	2	Par 5 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injections sous-cutanées.	Inoculation intracranienne du virus rabique des rues.	Inject. faites 12 et 4 jours avant l'infection.	—
8	2	Par 5 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injections sous-cutanées.	Inoculation intracranienne d'émulsion diluée du virus fixe.	Inject. faites 7 et 4 jours avant l'infection.	Prend la rage et meurt en même temps que les lapins de contrôle.

TABLEAU IV (*Suite*).

Nos des animaux en expérience (lapins).	NOMBRE d'injections.	MODE D'INJECTION Quantité et qualité d'émulsion injectée.	MODE d'infection.	DÉLAI entre l'injection et l'infection.	RÉSULTATS obtenus.
9	2	Par 5 c. c. d'émulsion filtrée et diluée du virus fixe en injections sous-cutanées.	Inoculation intracranienne d'émulsion diluée du virus fixe.	Inject. faites 14 et 11 jours avant l'infection.	Prend la rage et meurt en même temps que les lapins de contrôle.
10	2	Par 5 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injections sous-cutanées.	Idem.	Inject. faites 15 et 9 jours avant l'infection.	Résiste à la rage.
11	3	Par 5 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injections sous-cutanées. (Grand abcès purulent au point d'injection.)	—	Inj. faites 25, 16 et 8 jours avant l'infection.	Idem.
12	1	10 c.c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injection sous-cutanée.	—	Inj. 14 jours avant l'infection.	Résiste à la rage. La veille de l'inoculation intracranienne parésie des membres postérieurs, ensuite paralysie, qui dure 21 jours.
13	2	Par 5 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injections sous-cutanées.	N'a pas été inoculé sous la dure-mère, car le 6e jour après la première injection, et le 2e après la seconde, contracta la rage et mourut.		
14	2	5 c. c. et 3 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injections sous-cutanées.	Inoculation intracranienne du virus fixe.	Inject. faites 14 et 6 jours avant l'infection.	Prend la rage et meurt en même temps que les lapins de contrôle (lapins de pass.).
15	3	1 c. c. d'émulsion filtrée et diluée du virus fixe en injection intraveineuse et 2 fois par 3 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe en injections sous-cutanées.	Idem.	Inj. faites 16, 14 et 11 jours avant l'infection.	Idem.

TABLEAU VII

ESSAIS DE TRAITEMENT, AU MOYEN D'INJECTIONS INTRAVEINEUSES, SUR DES LAPINS INFECTÉS SOUS LA DURE-MÈRE AVEC UNE ÉMULSION ASSEZ ÉPAISSE DE VIRUS RABIQUE DES RUES.

Nos des animaux en expérience.	DATE et mode d'injection.	DATE ET MODE de traitement.	QUANTITÉ d'émulsion injectée.	NOMBRE d'injections.	RÉSULTATS
1	14/VI. Inoculation intracranienne d'émulsion assez épaisse du virus rabique des rues.	14/VI. 5 c. c. d'émulsion filtrée et diluée en injection intraveineuse. — 15/VI. Idem. — 20/VI. Idem. — 24/VI. Idem.	20 c. c.	4	Prend la rage le 27/VI. Paralysie et mort le 28/VI.
2	Idem.	14/VI. 3 c. c. d'émulsion filtrée et un peu plus épaisse du virus fixe en injection intraveineuse. — 15/VI. Idem. — 17/VI. 5 c. c. d'émulsion diluée du virus fixe. — 20/VI. 4 c. c. d'émuls. un peu plus épaisse du virus fixe. — 24/VI. 3 c. c. de la même émulsion.	18 c. c. d'émulsion un peu plus épaisse du virus fixe.	4	Prend la rage le 27/VI. Succombe le 29/VI.
3	—	14/VI. 2 c. c. d'émulsion filtrée et un peu plus épaisse du virus fixe en injection intraveineuse. — 15/VI. idem. — Le 21/VI et le 26/VI par 5 c. c. d'émulsion du cerveau d'un lapin immunisé en injections sous-cutanées.	4 c. c. d'émulsion un peu plus épaisse du virus fixe et 10 c. c. d'ém. du cerveau d'un lapin immunisé.	4	Prend la rage le 28/VI. Succombe le 29/VI.
4	—	A partir du 14/VI, pendant 12 jours, 15 injections sous-cutanées d'émulsion de cerveaux desséchés (4 séries) par 2 c. c. de chaque injection.	30 c. c. d'émulsion épaisse de cerveaux desséchés.	15	Prend la rage le 26/VI. Succombe le 28/VI.
5	—	Lapin de contrôle non traité.			Prend la rage le 28/VI.

TABLEAU VIII

ESSAIS DE TRAITEMENT SUR DES LAPINS APRÈS L'INFECTION PRÉALABLE PAR L'ÉMULSION ASSEZ ÉPAISSE DU VIRUS DES RUES

Nos des animaux en expérience.	MODE d'infection.	MODE de traitement.	DÉLAIS entre le moment d'infection et la 1re injection.	DURÉE du traitement.	NOMBRE d'injections.	QUANTITÉ d'émulsion injectée.	RÉSULTATS
1	Inoculation intracranienne d'émulsion non filtrée du virus rabique des rues.	Inject. intraveineuses d'émulsion filtrée du virus fixe.	24 heures.	10 jours.	4	20 c. c.	Tous les lapins prennent la rage en même temps que les lapins de contrôle.
2	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	5	Idem.	
3	Inoculation intracranienne d'émulsion filtrée (assez épaisse) du virus rabique des rues.	—	L'injection est faite le même jour, après l'infection.	2 jours.	3	16 c. c.	
4	Idem.	—	Idem.	Idem.	Idem.	18 c. c.	
5	—	—	—	—	—	27 c. c.	
6	—	—	—	3 jours.	4	25 c. c.	
7	—	—	—	Idem.	Idem.	30 c. c.	
8	—	—	—	—	5	39 c. c.	
9	—	Inject. intraveineuses d'émulsion filtrée du virus fixe, plus injection sous-cutanée d'émulsion épaisse du virus fixe.	—	—	3	16 c. c. d'émulsion filtrée plus 5 c. c. d'émulsion épaisse.	
10	—	Injections sous-cutanées d'après la méthode pastorienne.	—	10 jours.	19	45 c. c. d'émulsion épaisse.	

TABLEAU IX

ESSAIS DE TRAITEMENT SUR DES LAPINS APRÈS L'INFECTION PRÉALABLE PAR L'ÉMULSION FILTRÉE ET DILUÉE DU VIRUS DES RUES.

Nos des animaux en expérience.	MODE d'infection.	MODE de traitement.	DÉLAIS entre le moment d'infection et la 1re injection.	DURÉE du traitement.	NOMBRE d'injections.	QUANTITÉ d'émulsion injectée.	RÉSULTATS
1	Inocul. intracranienne d'émuls. filtrée et très diluée du virus rabique des rues.	Injections intraveineuses d'émulsion filtrée du virus fixe.	L'injection est faite le même jour, après l'infection.	2 jours.	3	15 c. c.	Résiste à l'infection.
2	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	4	35 c. c.	Idem.
3	—	—	—	—	6	20 c. c.	—
4	—	N'a pas été traité (lapin de contrôle).					Prend la rage après la période d'incubation de 16 j.
5	Inocul. intracranienne d'émulsion filtrée et diluée du virus rabique des rues.	Injections intraveineuses d'émulsion filtrée du virus fixe.	L'injection est faite le même jour, après l'infection.	2 jours.	5	37 c. c. d'émulsion filtrée et diluée.	Résiste à la rage.
6	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	4	17 c. c. d'émulsion filtrée et diluée.	Prend la rage après la période d'incubation de 26 j.
7	—	Injections sous-cutanées d'émulsion épaisse du virus fixe.	—	—	5	34 c. c. d'émulsion épaisse.	Prend la rage après la période d'incubation de 13 j.
8	—	N'a pas été traité (lapin de contrôle).					Idem.

On obtient les mêmes résultats sur les chiens. De quatre chiens inoculés dans la profondeur des muscles du membre postérieur, avec l'émulsion du cerveau d'un chien enragé, et traités ensuite par 2 injections intraveineuses, de 10 c. c. chacune, d'émulsion diluée du virus fixe, un seul prend la rage; les chiens de contrôle sont devenus enragés. (Tableau VI.)

TABLEAU VI

ESSAIS D'IMMUNISATION PRÉVENTIVE SUR DES CHIENS. ET TRAITEMENT (CONSÉCUTIF A L'INFECTION) AU MOYEN D'INJECTIONS INTRAVEINEUSES.

Nos des animaux en expérience.	NOMBRE d'injections.	QUANTITÉ et qualité de l'émulsion, mode d'injection.	MODE d'infection.	DÉLAIS entre les injections et l'infection.	RÉSULTATS obtenus.
1	3	23 c. c. d'émulsion filtrée du virus fixe en injections intraveineuses : la première fois, 8 c. c.; 7 j. après, 5 c. c.; 11 j. après la 2e injection, 10 c. c.	Le chien n'a pas été infecté dans le but de s'assurer de l'innocuité des injections intraveineuses.		Cinq mois sont écoulés; se trouve en ce moment en bonne santé.
2	2	10 c. c. et 6 c. c. d'émulsion filtrée en injections intraveineuses.	Inoculation intracranienne d'ém. du virus rabique des rues (cerveau).	Injections faites 16 et 6 jours avant l'infection.	Reste en bonne santé. Le lapin de contrôle succombe à la rage.
3	2	Par 10 c. c. d'émulsion filtrée du virus fixe en injections intraveineuses.	Inoculation intraoculaire d'émuls. du virus rabique des rues (cerveau).	Injections faites 23 et 14 jours avant l'infection.	Idem.
4	2	Par 10 c. c. d'émulsion filtrée du virus fixe en injections intraveineuses.	5 injections dans la profondeur des muscles du membre postérieur de l'émulsion du virus rabique des rues.	Injections faites 1 et 8 jours après l'infection.	Prend la rage paralytique 16 j. après l'infec., succombe 4 j. après. Le lapin de contrôle inoculé sous la dure-mère prend la rage après une période d'inoculat. de 15 j., succombe 4 j. apr.
5	2	10 et 8 c. c. d'émulsion filtrée du virus fixe en injections intraveineuses.	Idem.	Injections faites 3 et 10 j. après l'infection.	Résiste à l'infection.
6	15	40 c. c. d'émulsion épaisse du virus fixe injectés en 4 séries (en suivant la méthode ordinaire et en commençant par le cerveau desséché de 7 j.) en inject. sous-cutanées.	—	La 1re injection est faite le 1er j. après l'infection. On poursuit les inject. pendant 15 j.	Idem.
7	Ce chien a été infecté comme les chiens nos 4, 5 et 6, pour servir de contrôle : il n'a pas reçu d'injections intraveineuses. Le 23e jour après l'infection il prend la rage et succombe 3 jours après. Le lapin de contrôle inoculé avec la même émulsion sous la dure-mère prend la rage après une période d'incubation de 10 jours et succombe 5 jours après.				

Un second lot de 4 chiens est inoculé avec du virus des rues, de la même façon, et traité, 2-3 jours après l'infection avec l'émulsion filtrée de virus fixe; le premier a reçu en 2 injections intraveineuses 36 c. c., le second 43 c. c., en 2 fois, le troisième 80 c. c. en 4 injections. Tous trois résistent. Tandis qu'un quatrième chien de contrôle, traité par les injections sous-cutanées, prend la rage après la période d'incubation de 23 jours. (Tableau X.)

TABLEAU X

ESSAIS DE TRAITEMENT SUR DES CHIENS APRÈS INFECTION INTRAMUSCULAIRE PAR L'ÉMULSION DU VIRUS DES RUES

Nos des animaux en expérience.	MODE d'infection.	MODE de traitement.	DÉLAIS entre le moment d'infection et la 1re injection.	DURÉE du traitement.	NOMBRE d'injections.	QUANTITÉ d'émulsion injectée.	RÉSULTATS
1	Injections intramusculaires d'émulsion épaisse du virus rabique des rues faites en trois points dans l'épaisseur des muscles des membres postérieurs.	Injections sous-cutanées d'après la méthode pastorienne.	L'injection est faite le même jour après l'infection.	18 jours	22	100 c.c. d'émulsion épaisse.	Prend la rage après la période d'incubation de 22 j.
2	Idem.	Injections intraveineuses d'émulsion filtrée et diluée.	Idem.	1 jour	2	36 c.c. d'émulsion filtrée et diluée.	Résiste à la rage.
3	—	Idem.	—	2 jours	2	43 c. c.	Idem.
4		—	—	4 jours	4	80 c. c.	—

Dans la troisième série, les chiens sont infectés sous la dure-mère; 4 avec l'émulsion épaisse, 4 autres l'émulsion toujours virulente, mais filtrée et diluée.

Les premiers, traités ensuite au moyen de 3 à 5 injections dans la veine, reçoivent 26 à 80 c. c. en tout, d'émulsion filtrée du virus fixe; ils succombèrent comme les chiens de contrôle traités au moyen d'injections sous-cutanées (Tableau XI).

TABLEAU XI

ESSAIS DE TRAITEMENT SUR DES CHIENS APRÈS INFECTION PRÉALABLE PAR L'INOCULATION INTRACRANIENNE D'ÉMULSION ASSEZ ÉPAISSE.

Nos des animaux en expérience.	MODE d'infection.	MODE de traitement.	DÉLAIS entre le moment d'infection et la 1re injection.	DURÉE du traitement	NOMBRE d'injections.	QUANTITÉS d'émulsion injectée.	RÉSULTATS
1	Inoculation intracranienne d'émulsion filtrée et diluée (dans la proportion de 1 p. 150) du virus rabique des rues.	Injections intraveineuses d'émulsion filtrée du virus fixe.	L'injection est faite le même jour après l'infection.	2 jours.	3	26 c.c. d'émulsion filtrée du virus fixe.	Tous les chiens prennent la rage presque en même temps que les chiens de contrôle.
2	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	40 c. c.	
3	—	—	—	—	—	56 c. c.	
4	—	—	—	3 jours.	5	80 c. c.	
5	—	Injections sous-cutanées d'après la méthode pastorienne : 5 séries.	—	14 jours.	20	160 c. c.	

Les 4 autres, qui ont été inoculés sous la dure-mère avec l'émulsion diluée, ont reçu ensuite en 4 à 5 injections intraveineuses 50 à 95 c. c. d'émulsion filtrée et diluée du virus fixe ; 3 d'entre eux restent jusqu'à présent en surveillance et en bonne santé ; le quatrième est mort deux mois après l'infection sans manifester de symptômes suspects. Donc, l'effet curatif des injections intraveineuses se manifeste sur les chiens aussi bien que sur lapins (Tableaux XII).

A la fin de mes recherches, j'ai tenu à vérifier la possibilité d'arriver à l'immunité antirabique, en se servant du virus rabique (cerveau d'animal enragé) rendu non virulent par un agent atténuant quelconque, la dessiccation par exemple, le chauffage au bain-marie, la conservation dans l'alcool, etc., thèse posée par MM. Protopopoff et Babès. J'ai opéré sur 8 lapins en introduisant en 2 et 3 fois une émulsion non virulente, puisqu'elle était sans effet quand on l'inoculait sous la dure-mère,

TABLEAU XII

ESSAIS DE TRAITEMENT SUR DES CHIENS APRÈS INFECTION INTRACRANIENNE PRÉALABLE PAR L'ÉMULSION FILTRÉE ET DILUÉE DU VIRUS DES RUES

Nos des animaux en expérience.	MODE d'infection.	MODE de traitement.	DÉLAI entre le moment d'infection et la 1re injection.	DURÉE du traitement.	NOMBRE d'injections.	QUANTITÉS d'émulsion injectée.	RÉSULTATS
1	Inoculat. intracranienne d'émulsion filtrée et diluée du virus rabique des rues.	Une injection intraveineuse suivie d'inject. sous-cutanées, d'ap. la méthode pastorienne.	L'injection est faite le même jour après l'infection.	13 j.	1 inject. intraveineuse + 19 inject. sous-cutanées.	20 c. c. d'émuls. filtrée et diluée + 95 c. c. d'émulsion épaisse.	Reste sain pendant 2 mois, s'enfuit ensuite.
2	Idem.	Inj. intraveineuses.	Idem.	3	4	50 c. c.	Résiste à la rage.
3	—	Idem.	—	2	Idem.	56 c. c.	Idem.
4	—	—	—	3	5 inj.	95 c. c.	—
5	—	N'a pas été traité (chien de contrôle). — Prend la rage après 8 jours et succombe en présentant les symptômes de la rage paralytique.					

des lapins. Les uns ont reçu en tout 12 c. c. d'émulsion filtrée et diluée dans les veines, les autres 20 c. c. d'émulsion épaisse dans le péritoine ; 14-18 jours après je les ai inoculés sous la dure-mère avec du virus fixe ou bien du virus rabique des rues. Tous ont pris la rage en même temps que les lapins de contrôle. (Tableau V.)

La quantité de lapins sur lesquels j'ai fait cette expérience n'est pas grande, il est vrai, mais l'identité des résultats obtenus sur tous les huit permet — il me semble — de nier la possibilité d'immunisation au moyen de la matière nerveuse d'animal enragé dont la virulence a été détruite.

Je crois pouvoir mentionner en cette place une des observations faites pendant mes recherches actuelles, encore inachevées, sur le sérum antirabique, cette observation servant — de même que l'expérience citée tout à l'heure — d'argument contre le pouvoir immunisant du virus rabique dont la virulence a été

TABLEAU V

ESSAIS D'IMMUNISATION DES LAPINS, AVEC L'ÉMULSION DU VIRUS RABIQUE RENDU NON VIRULENT, SUIVIE D'INFECTION INTRACRANIENNE PAR LE VIRUS RABIQUE FIXE OU LE VIRUS DES RUES.

Nos des animaux en expérience.	NOMBRE d'injections.	QUANTITÉ et qualité d'émulsion injectée. Mode d'injection.	MODE d'infection.	DÉLAIS entre les injections et l'infection.	RÉSULTATS obtenus.
1	1	1 c. c. d'émulsion filtrée du cerveau non virulent (soumis à la dessiccation de 8 jours) en injection intraveineuse.	Inoculation intracranienne d'émulsion du virus fixe.	Injection faite 8 jours avant l'infection.	Tous les lapins prennent la rage et succombent en même temps que les lapins de contrôle.
2	1	Idem.	Idem.	Injection faite 16 j. avant l'infection.	
3	2 fois	Par 1 c. c. d'émulsion filtrée du cerveau non virulent (soumis à la dessiccation de 8 jours) en injections intraveineuses.	—	Injections faites 18 et 12 j. avant l'infection.	
4	2 fois	Par 5 c. c. d'émulsion filtrée du cerveau non virulent (soumis à la dessiccation de 8 jours) en injections intraveineuses.	Inoculation intracranienne du virus rabique des rues.	Injections faites 16 et 6 jours avant l'infection.	
5	2 fois	Par 5 c. c. d'émulsion épaisse du cerveau non virulent (soumis à la dessication de 8 jours) en injections intrapéritonéales.	Inoculation intracranienne d'émulsion filtrée et diluée du virus fixe.	Injections faites 16 et 7 j. avant l'infection.	
6	2 fois	Par 10 c. c. d'émulsion épaisse du cerveau de lapin de passage conservé dans l'alcool jusqu'à la perte de virulence (9 et 7 jours) en injections intrapéritonéales.	Idem.	Injections faites 17 et 7 j. avant l'infection.	
7	2 fois	7 et 5 c. c. d'émulsion filtrée et diluée du cerveau de lapin de passage conservé dans l'alcool jusqu'à la perte de virulence (9 et 7 jours) en injections intraveineuses.	—	Injections faites 14 et 5 j. avant l'infection.	
8	2 fois	3 c. c. 5 et 5 c. c. d'émulsion filtrée et diluée du virus fixe rendu non virulent (plongé pendant 7-10 minutes dans de l'eau bouillante) en injections intraveineuses.	—	Injections faites 16 et 6 j. avant l'infection.	

atténuée jusqu'à devenir nulle. J'ai à ma disposition un sérum qui présente nettement le pouvoir bactéricide spécifique; son action sur la virulence de la matière nerveuse rabique est de même ordre que celle de la dessiccation, du chauffage, ou encore de l'action de l'alcool, etc. En effet, si on inocule un lapin sous la dure-mère avec un mélange d'émulsion filtrée du virus fixe et de sérum, l'effet de l'inoculation est nul, le lapin ne prend pas la rage.

C'est ce mélange neutre que j'ai injecté à 2 lapins, dans la veine, en 2 à 3 fois par 3 à 4 c. c.; 15 jours après la première injection, les lapins ont été inoculés sous la dure-mère avec du virus fixe; tous succombèrent à la rage en même temps que les lapins de contrôle. Donc, la matière rabique non virulente n'exerce aucune action immunisante.

Qu'il me soit permis d'ajouter que l'émulsion employée, dans l'expérience précédente, en mélange avec le sérum antirabique, injectée seule ou mélangée au sérum antidiphtérique a manifesté son pouvoir immunisant; car tous les lapins inoculés ensuite sous la dure-mère avec du virus fixe résistèrent à la rage. Cette expérience démontre aussi que le sérum anti-diphtérique n'a aucune action et que seul le sérum antirabique est capable de modifier le virus rabique.

En résumé toutes les expériences citées nous conduisent aux conclusions suivantes :

1) Les injections intraveineuses du virus rabique ne sont pas dangereuses, à la condition que le virus soit en émulsion filtrée et diluée, que l'émulsion soit chauffée à 37° et qu'elle soit poussée d'un mouvement lent[1].

2) Par les injections intraveineuses on *rend* plus rapidement les animaux réfractaires à la rage et on obtient uue immunité plus solide qu'avec les autres modes de vaccination; ces injections faites au lapin (l'animal le plus sensible à la rage), même après l'inoculation intracranienne du virus rabique (infection toujours mortelle), arrivent quelquefois à le préserver de la maladie.

1. Si ces conditions sont remplies, si par conséquent on exclut la possibilité de la formation des embolies, les injections sont toujours inoffensives. Pendant toutes mes recherches, sur un nombre très considérable de lapins en expérience, un seul a succombé à la suite de l'injection intraveineuse.

3) La matière nerveuse rabique, rendue non virulente par un agent atténuant quelconque, n'a pas d'action immunisante ; tout au plus, elle exerce peut-être un pouvoir vaccinant, en faisant l'organisme moins sensible à l'introduction consécutive du virus renforcé.

Étant donnée la grande importance qu'il y a à développer rapidement une immunité renforcée chez les personnes mordues par des animaux enragés, surtout dans les cas de morsures graves ; étant données d'autre part non seulement l'innocuité mais aussi l'efficacité des injections intraveineuses de virus finement émulsionné, mon maître, M. le professeur Wysokowicz a fait — il y a un an — dans des cas d'une gravité excessive les premiers essais d'injections intraveineuses du virus fixe sur les mordus traités à l'Institut Bactériologique de Kief.

Jusqu'à ce moment il y a eu 70 personnes mordues traitées par des injections intraveineuses du virus fixe. Ces injections ont donné en somme des résultats encourageants.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au professeur Wisokowicz pour les conseils qu'il m'a donnés et pour la part personnelle qu'il a prise aux expériences de ce travail.

LITTÉRATURE

Högyes, *Die Lyssa*, monographie, 1890.

Pasteur, *Comptes rendus*, 1882, t. XCV. Nouveaux faits pour servir à la connaissance de la rage.

Galtier, *Comptes rendus* 1881, t. XCIII. Les injections de virus rabique dans le torrent circulatoire.

Galtier, *Comptes rendus* 1888, t. CVI. Nouvelles expériences sur l'inoculation antirabique en vue de préserver des animaux herbivores.

Roux et Nocard, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1888, nº 17. Expériences sur la vaccination des ruminants contre la rage, par injections intraveineuses de virus rabique.

Protopopoff, *Les injections préventives antirabiques* (en langue russe), 1888, Charkow.

Pasteur, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887, nº 1.

Moncet, *Revue vétérinaire*, 1898, nº 5.

Kraiouschkine, *Archives des sciences biologiques St-Pétersburg*, t. III. Action du virus fixe en injections sous-cutanées.

ACTION DE LA CHALEUR SÈCHE SUR LES SPORES
ET LA TOXINE TÉTANIQUE

Par MM. V. MORAX et A. MARIE

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

On a depuis longtemps remarqué que la chaleur agit de la même façon sur les diastases et sur les toxines microbiennes en solution. On sait, par exemple, qu'une température de 58°, maintenue pendant 2 heures, détruit presque complètement l'activité de la toxine diphtérique. De même, un chauffage à 80°, pendant 30 minutes, rend la toxine tétanique inoffensive.

En ce qui concerne les enzymes, on a constaté que d'une manière générale elles perdent définitivement leur action diastasique à des températures variant entre 55 et 80°, suivant la réaction et la nature du milieu dans lequel elles sont contenues : ainsi l'amylase, qui à 65° éprouve en quelques minutes un affaiblissement sensible, est complètement détruite après une assez courte exposition à 75-76°.

Il en va tout autrement si, au lieu d'agir sur les diastases en solution, la chaleur exerce son action sur ces mêmes substances desséchées. M. Hufner[1], le premier, a montré que de la trypsine pancréatique desséchée pouvait être chauffée à 100° sans perdre aucune de ses propriétés ; M. Salkowski[2] a établi ensuite qu'une température comprise entre 160 et 170° est nécessaire pour les annihiler.

Plus tard, la même observation fut faite pour d'autres diastases, telles que l'émulsine, la pepsine, la plasmase.

Il nous a paru intéressant d'entreprendre des recherches analogues sur les toxines desséchées, afin de voir si ces substances présenteraient la même résistance que les diastases aux températures élevées.

Nous avons choisi la toxine tétanique qu'il est facile d'obtenir à l'état sec et dont l'inoculation de doses infinitésimales suffit pour produire les réactions les plus nettes chez les petits animaux de laboratoire. En outre, nous pouvions comparer

1. Hufner, *Jarbuch. für prakt. Chemie N.S.* T. XVIII et *Pflugers Archiv.* T. XL.
2. Salkowski, *Virchow's Archiv.* T. LXX et LXXI.

l'action de la chaleur sur les spores tétaniques desséchées et sur la toxine sèche.

La toxine tétanique que nous avons employée a été préparée par précipitation au moyen du sulfate d'ammoniaque, de cultures en bouillon filtrées. Le précipité recueilli sur un filtre, desséché dans le vide et réduit en poudre est conservé dans un excicateur. Il va sans dire que la toxine obtenue de cette façon n'est rien moins qu'un produit pur, mais qu'il s'agit d'un mélange complexe dans la composition duquel entrent les albumoses du milieu de culture, une petite quantité de sels [1], et des produits microbiens, parmi lesquels la toxine tétanique.

La proportion d'eau qui persiste est excessivement faible, ainsi que le prouve l'expérience suivante :

Un décigramme de toxine tétanique est soumis pendant 10 minutes à 158°; une nouvelle pesée montre qu'il a perdu 0,0045, soit 4,5 0/0 de son poids primitif.

Nous avons expérimenté avec plusieurs échantillons différents de toxine tétanique : on trouvera plus loin le résumé de nos expériences. Ces toxines ont été soumises à des températures comprises entre 120 et 159°.

Nous avons d'abord utilisé, pour ce chauffage, le four à air chaud, mais nous lui avons préféré, par la suite, le bain de paraffine.

De petites tubes de verre contenant 0,1 décigramme de toxine sont plongés, ainsi qu'un thermomètre, dans un tube de verre renfermant de la paraffine et baignant lui-même dans une capsule de porcelaine remplie de cette substance. Un thermo-régulateur placé dans le bain extérieur maintient la température voulue pendant la durée du chauffage.

Les nombreuses expériences que nous avons faites nous permettent de dire que la toxine tétanique, de même que les diastases, supporte à l'état sec des températures beaucoup plus élevées qu'à l'état liquide.

Une toxine tétanique chauffée 15 minutes à 120° présente le même degré d'activité qu'avant le chauffage; la même dose minima peut tuer une souris, mais avec un retard de 3 jours.

1. Nous avons expérimenté aussi la toxine obtenue par dessiccation immédiate de cultures en bouillon filtrées; la quantité de NaCl est telle que la poudre est très hygroscopique et que dans le chauffage on ne peut négliger l'effet de la proportion d'eau contenue dans une telle toxine.

Un chauffage à 135° pendant 20 minutes ne paraît pas altérer la toxine d'une manière plus sensible que le chauffage à 120°. Exposée à des températures de 150, 152, 154°, la toxine tétanique conserve encore une activité relativement forte, à la condition que le chauffage n'excède pas 15 à 20 minutes de durée.

Voici quelques exemples : la toxine chauffée 20 minutes à 150° a tué la souris en 4 jours avec deux fois la dose mortelle; par contre, 5 doses mortelles de tétanine chauffée à 154° pendant 3 minutes n'arrivent plus à tuer qu'en 9 jours une souris de poids moyen.

Il faut dépasser la température de 150°, et monter jusqu'à 159° pour anéantir l'activité d'un échantillon de toxine. Et même à cette température de 159°, les principes tétanigènes ne sont pas détruits en totalité, puisqu'une dose 100 fois mortelle d'une toxine portée pendant 20 minutes à 159° parvient encore à provoquer chez la souris un tétanos local.

Tels sont les résultats obtenus lorsque la température n'agit pas sur la toxine au delà de 15 à 20 minutes, car la durée du chauffage, plus que l'élévation thermique, semble exercer une influence sur la toxine.

La même température de 140°, presque indifférente quand elle n'agit pas au delà de 20 minutes, altère sensiblement la toxine, dès que le chauffage est prolongé pendant une heure. Il faut alors une dose 200 fois mortelle pour obtenir un tétanos local. Au bout de 3 heures, la même température a complètement détruit la toxine tétanique.

La prolongation du chauffage paraît être moins défavorable aux propriétés des enzymes qu'à celles des toxines, puisque M. Salkowski a montré que de la pepsine convenablement desséchée peut être soumise pendant 3 ou 4 heures à 160° sans présenter aucune différence avec la pepsine non chauffée.

Nous avons voulu rechercher quelles relations existent entre la température nécessaire pour la destruction de la toxine et celle qui supprime toute végétabilité des spores tétaniques; en d'autres termes, il était intéressant de voir s'il y a corrélation entre la destruction de la toxine par la chaleur et la désorganisation de la matière vivante.

Les spores tétaniques provenaient des mêmes cultures qui nous avaient fourni notre toxine. Ces cultures étant préparées

à la faveur du *Bacillus subtilis*, suivant les indications de M. Debrand[1]; il en résultait que les spores tétaniques se trouvaient mélangées à des spores de *subtilis*.

Ces spores étaient placées dans de petits tubes et chauffées au bain de paraffine dans les mêmes conditions que la toxine.

Pour éprouver leur vitalité, il était fait, chaque fois, des inoculations au cobaye et des cultures en bouillon. M. Vaillard[2] a démontré que les spores tétaniques, débarrassées de leur toxine et inoculées à l'état de pureté, sont incapables de germer dans l'organisme animal, mais que l'addition d'acide lactique ou bien de certains microbes permet la végétabilité de ces spores. Dans nos expériences, nous avons toujours inoculé des cobayes avec et sans acide lactique.

Voici les résultats que nous avons obtenus. Après un chauffage pendant 20 minutes à 152°, les spores de *B. subtilis* se sont développées au bout de 24 heures, alors que les spores tétaniques étaient détruites.

Une température de 155°, pendant 20 minutes, ne tue pas les spores du *subtilis*, mais bien celles du tétanos.

Il ressort de ces expériences que la chaleur sèche détruit plus rapidement la vitalité des spores tétaniques que l'activité de la toxine. Dans toutes nos expériences, nous voyons la toxine conserver une activité relative, après un chauffage à des températures qui détruisent définitivement la végétabilité des spores tétaniques, puisqu'il suffit d'un chauffage à sec à 140° pendant 1 heure pour que leur inoculation soit non seulement inoffensive pour un animal aussi sensible que le cobaye, mais encore pour qu'elles ne puissent se développer en présence du *B. subtilis*.

Il est intéressant de rapprocher de nos expériences les observations faites par M. L. Camus sur la résistance des sérums desséchés aux températures élevées. D'après lui, le sérum antidiphtérique et le sérum antivenimeux[3] supportent un chauffage de 15 minutes à 140° et de 30 minutes à 110° sans perdre leurs propriétés.

1. Debrand, Ces *Annales* 1900, n° 11.

2. Vaillard, Ces *Annales* 1892, n° 6.

3. Des expériences que nous n'avons pas poursuivies nous ont montré que le venin desséché (venins de cobra et de bothrops, de M. Calmette) conserve encore la moitié de son activité après un chauffage de 15 minutes à 152°, et qu'une température de 158° est nécessaire pour le rendre presque inoffensif. (Voir, plus loin, le résumé de ces recherches.)

RÉSUMÉ DES EXPÉRIENCES

I. Action de la chaleur sur la toxine tétanique

1. 120° PENDANT 15 MINUTES

DOSE MINIMA MORTELLE = 0.002

19-II-02	20	21	22	23	24	25	26	27
Souris 0.002........	0	0	—	=	≡	≡	≣	+
Souris 0.0015.......	0	—	—	—	—	=	=	=
Souris 0.002 T. T. non chauffée.	—	≡	≣	+				

2. 140° PENDANT 20 MINUTES

DOSE MINIMA MORTELLE = 0.002

5-III-02	6	7	8	9	10	11
Souris 0.002..........	0	0	0	—	=	+
Souris 0.004..........	0	—	=	+		
Souris 0.02...........	+					

3. 150° PENDANT 20 MINUTES

SOURIS DE 8 GRAMMES. DOSE MINIMA MORTELLE = 0.002

7-III-02	8	9	10	11
Souris 0.004......	0	—	=	≡ +
Souris 0.02.......	0	—	≡ +	

4. 150° PENDANT 20 MINUTES

SOURIS DE 15 GRAMMES. DOSE MINIMA MORTELLE = 0.002

10-III	11	12	13	14	15	16	17	18
Souris 0.004........	0	0	—	=	=	=	≡	+
Souris 0.01.........	0	—	—	≡	+			

5. 152° PENDANT 20 MINUTES. — 156° PENDANT 1 MINUTE

DOSE MINIMA MORTELLE = 0.0000005

3-IV	4	5	6	7	8	9
Souris 0.0001.........	0	0	0	0	0	0
Souris 0.00001........	0	0	0	0	0	0
Souris 0.000001.......	0	0	0	0	0	0

6. 154° PENDANT 3 MINUTES

DOSE MINIMA MORTELLE = 0,002.

10-III	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Souris 0,004..	0	0	—	—	—	—	—	—	—
Souris 0.01...	0	0	—	=	=	=	=	=	+

7. 158° PENDANT 15 MINUTES

DOSE MINIMA MORTELLE = 0,001.

28 II	1-III	2	3	4	5	6	7
Souris 0,002.....	0	0	0	0	0	0	0
Souris 0,004.....	0	0	0	0	0	0	0

8. 158° PENDANT 10 MINUTES

DOSE MINIMA MORTELLE = 0,001.

14-III	15	16	17	18	19	20	21
Souris 0,004.....	0	0	0	0	0	0	0
Souris 0,01......	0	0	0	0	0	0	0
Souris 0,02......	0	0	0	0	0	0	0

9. 159° PENDANT 20 MINUTES

DOSE MINIMA MORTELLE = 0.00001

2-IV	3	4	5	6	7	8	9
Souris 0,001 100 doses mortelles	0	0	—	—	—	—	—
Souris 0.0001 ...	0	0	0	0	0	0	0

10. 155° PENDANT 20 MINUTES

DOSE MINIMA MORTELLE = 0.00001

2-IV	3	4	5	6	7	8	9
Souris 0.001 100 doses mortelles	0	0	—	—	—	—	—
Souris 0.0001...	0	0	0	0	0	0	0
Souris 0.00001 ..	0	0	0	0	0	0	0

11. 147° PENDANT 3 HEURES

DOSE MINIMA MORTELLE = 0.0000005

5-IV	6	7	8	9	10	11
Souris 0.00001........	0	0	0	0	0	0
Souris 0.000001.......	0	0	0	0	0	0

12. 140° PENDANT 3 HEURES

DOSE MINIMA MORTELLE = 0.0000005

8-IV	9	10	11	12
Souris 0.0001.....	0	0	0	0
Souris 0.001......	0	0	0	0

13. 140° PENDANT 1 HEURE

DOSE MINIMA MORTELLE = 0.0000005

8-IV	9	10	11	21
Souris 0.0001.....	0	—	—	—
Souris 0.001......	—	=	≡	≡

II. Action de la chaleur sur les spores desséchées du B. subtilis et du B. tétanique

1. 152° PENDANT 20 MINUTES

Cultures............ { B. Subtilis. — Développement. / B. tétanique. — Pas de développement. }

Inoculation à 3 cob. Rien.

2. 155° PENDANT 20 MINUTES

Cultures............ { B. Subtilis. — Développement. / B. tétanique. — Pas de développement. }

Inoculation à 4 cob. Rien.

3. 158° PENDANT 10 MINUTES

Cultures........................ B. Subtilis. — Développement.

4. 158° PENDANT 15 MINUTES

Cultures............. { B. Subtilis... / B. tétanique. } Pas de développement.

Inoculation à 3 cob. Rien.

5. 120° PENDANT 3 HEURES

Cultures............. { B. Subtilis......... / B. tétanique........ } Développement.

Inoculation à 2 cob. Rien.

6. 147° PENDANT 3 HEURES

Cultures.................. { B. Subtilis.............. / B. tétanique............. } Rien.

Inoculation à 2 cob. Rien.

7. 140° PENDANT 3 HEURES

Cultures .... { B. Subtilis .... / B. tétanique .... } Rien.

8. 140° PENDANT 1 HEURE

Cultures .... { B. Subtilis .... / B. tétanique .... } Rien.

III. Action de la chaleur sur le venin desséché

ANIMAUX	POIDS	LIQUIDE inoculé.	MODE d'inoculat.	HEURE d'inoc.	HEURE de la mort.	19	20	21	22	23	24
Lapin 89.	1.570	0 c. c. 2 venin non chauffé	Sous-cutanée.	11h,41	2h,15						
Lapin 31.	1.970	id.	Veineuse.	11h,40	12h,09						
Lapin 43	1.300	0 c. c. 2 venin chauffé à 152°.	Sous-cutanée.	11h,46	5h,30						
Lapin 85.	1.850	id.	Veineuse.	11h,45	12h,35						
Lapin 21.	1.400	0 c. c. 2 venin chauffé à 158°.	Sous-cutanée.	11h,49	0	0	+				
Lapin 24.	1.750	id,	Veineuse.	11h,48	0	0	0	0	0	0	+

SUR UN NOUVEAU PROCÉDÉ DE CULTURE DU TÉTANOS

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

Par le Dr L. DEBRAND

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Dans une précédente publication [1], j'ai démontré qu'il y a identité entre la toxine produite par la culture anaérobie du bacille de Nicolaier et la toxine résultant de la culture, à l'air libre, du même bacille associé au *Bacillus subtilis*. Si les toxines sont identiques, ajoutais-je, le sérum fourni par les animaux immunisés avec l'une ou l'autre aura les mêmes propriétés. Le but de ce travail est de prouver qu'il en est ainsi.

La culture mixte, on se le rappelle, s'effectue par le simple mélange du bacille du tétanos et du B. subtilis dans un bouillon d'âge quelconque, contenu dans un récipient bouché par un tampon d'ouate. Est-il indispensable, de prendre chaque fois pour semence un bacille tétanique provenant directement d'une culture anaérobie? S'il en était ainsi, le nouveau procédé n'aurait guère d'avantage sur l'ancien. Il est facile de tourner cette difficulté.

On fait une culture mixte de tétanos ordinaire et de B. subtilis. Le jour où elle a atteint son maximum de toxicité (6e jour) on la soumet à l'ébullition pendant 2 minutes. On tue ainsi les bacilles. On agite avec soin le récipient, afin de répartir les spores dans toute la masse liquide. On remplit alors un très grand nombre de pipettes qu'on ferme à la lampe. On peut ainsi faire une abondante provision de semences, que l'on tiendra en réserve à l'obscurité, à la température du laboratoire, voire même à la glacière. Vienne le moment de faire une culture mixte, on ouvre la pipette et l'on procède à l'ensemencement comme de coutume. On voit donc qu'il suffit d'entretenir à l'abri de l'air le bacille tétanique qui doit servir à ensemencer les cultures.

1. Ces *Annales*, novembre 1900.

Le grand ennemi de ces cultures mixtes, c'est l'air qui exerce une influence délétère sur les spores elles-mêmes, si celles-ci sont conservées en milieu liquide et à l'air. Aussi, si les semences n'étaient pas mises à l'abri de l'air, elles deviendraient bientôt inactives. Le B. subtilis lui-même perd la propriété de faire pousser le tétanos au bout d'un certain temps, si on le laisse séjourner dans le bouillon des tubes aérobies où il a poussé, sans fermer le tube à la lampe : capuchonner est une précaution insuffisante. Pour conserver au B. subtilis toute son activité, il faut faire de temps en temps des passages sur gélose; il vaut même mieux le conserver sur gélose jusqu'au jour de l'ensemencement.

Cette action nocive de l'air nous explique aussi pourquoi un *Bacillus subtilis* qui résistait à 1 h. 20 d'ébullition, au moment où il a été isolé, supporte à peine pendant une 1/2 heure la température de 100°, lorsqu'il a été immergé pendant longtemps dans le bouillon de culture, soumis à l'action de l'air ambiant.

C'est avec la toxine ainsi préparée que j'ai fait les expériences dont il va être maintenant question. 1/200 de c. c. de cette toxine donnait un tétanos rapidement mortel aux cobayes, mais il va sans dire que cette dose ne représente pas la dose minima mortelle. Par mon procédé, j'obtiens une toxine aussi forte qu'avec le procédé classique. J'ai déjà indiqué, dans la première partie de ce travail, que j'avais doublé la toxicité de mon bacille par le procédé des sacs, mais en retirant le sac du péritoine d'autant plus tôt que la toxicité s'exaltait davantage; j'ai obtenu un microbe produisant une toxine qui tue un cobaye de 400 grammes en 3 jours avec 1/1200 de c. c. et la souris en 5 jours avec 1/6000. On peut même obtenir davantage, mais cela n'a pas d'importance dans la question qui nous occupe. Dans tous les cas, quel que soit le bacille employé, la toxicité des cultures anaérobies ordinaires sera la même que celle des cultures en symbiose des bacilles subtilis et tétanique.

C'est la toxine ainsi préparée qui m'a servi à immuniser les lapins. J'ai commencé par leur injecter un mélange de toxine et de liqueur de Gram, d'après le procédé de MM. Roux et Vaillard[1]. Le tableau ci-joint indique la marche de l'immunisation d'un lapin contre le tétanos.

1. Ces *Annales*, février 1893.

DATES	POIDS	TOXINE	POINTS D'INOCULATION	OBSERVATIONS
Décembre 20.	1980 gr.	Toxine... 2 c. c. Gram.... 1 c. c.	Peau du dos.	
— 24.	2000 —	Toxine .. 4 c. c. Gram.... 4 c. c.	id.	
— 28.	2050 —	Toxine .. 8 c. c. Gram.... 4 c. c.	id.	
Janvier 1er.	2050 —	Toxine... 10 c. c. Gram.... 2 c. c.	id.	
Janvier 8.	2050 gr.	Tox. pure. 5 c. c.	Peau du dos.	
— 14.	2035 —	id. 10 c. c.	id.	
— 21.	2170 —	id. 15 c. c.	id.	
Février 1er.	2180 —	id. 20 c. c.	id.	
Février 11.	2212 gr.	Tox. pure. 30 c. c.	Péritoine.	
— 18.	2250 —	id. 40 c. c.	id.	
— 25.	2270 —	id. 50 c. c.	id.	
Mars. 5.	2360 —	id. 60 c. c.	Peau et Veine.	Veine marginale de l'oreille.
Mars 16.	2365 gr.	Tox. pure. 75 c. c.	Veine marg.	
— 26.	2450 —	id. 80 c. c.	Périt.-Veine.	
Avril 5	....	....	....	Je prends 40 c. c. de sang.
Juin. 20.	2520 gr.	Tox. pure. 35 c. c.	Péritoine.	Le 10 avril, l'animal prend cette maladie du lapin, désignée sous le nom vulgaire de « maladie du nez ». Je lui fais des insufflations quotidiennes de sulfobore et je désinfecte avec une solution de sublimé à 1/1000 ses pattes antérieures. L'animal se rétablit peu à peu et, lorsqu'il a repris son embonpoint, je recommence les inoculations de toxine.
Juillet 1er.	2600 —	id. 40 c. c.	id.	
— 15.	2800 —	id. 50 c. c.	id.	
Août 1er.	3200 —	id. 50 c. c.	id.	
— 15.	3320 —	id. 50 c. c.	id.	
Septembre 1er.	3300 —	id. 60 c. c.	Peau.	
— 15.	3320 —	id. 60 c. c.	Péritoine.	
— 24.	3360 —	id. 80 c. c.	id.	
Octobre. 12.	3250 —	id. 100 c. c.	Périt. et Veine.	
— 28.	3300 —	id. 120 c. c.	id.	
Novembre....	....	....	....	Je prends 40 c. c. de sang.
Décembre 3.	3280 —	Tox. pure. 100 c. c.	Périt. et Veine.	
— 13.	....	....	....	Je prends 40 c. c. de sang.

Le procédé exposé dans ce tableau diffère peu, on le voit, de celui qu'a indiqué M. Vaillard. Il permet d'opérer plus lentement, avantage appréciable lorsqu'on a affaire à des animaux malingres ou de petite taille. Grâce à cette gradation prudemment progressive des doses de toxine, aucun des 20 lapins que j'ai immunisés n'est mort du tétanos, une fois que la formule a été établie.

Cette formule est la suivante :

Partant de 2 grammes de toxine et de 1 gramme de liqueur de Gram, injecter sous la peau, tous les 4 jours, une dose double de la précédente, et cela 3 fois de suite; 4 jours plus tard, parfaire l'immunisation en inoculant à l'animal 10 grammes de toxine et 2 grammes de liqueur iodo-iodurée; 4 jours plus tard, donner 5 grammes de toxine pure. L'embonpoint de l'animal étant le critérium d'une immunisation bien supportée, on ne donne la toxine pure que quand celui-ci a recouvré et même dépassé son poids primitif. Pendant 4 semaines on augmente la dose de 5 grammes chaque fois, et pendant 4 autres semaines de 10 grammes. Lorsque le lapin supporte 60 grammes de toxine, on peut lui donner celle-ci *ad libitum.*

Quand on injecte plus de 20 c. c. il faut faire plusieurs piqûres ou recourir à la voie veineuse ou intra-péritonéale. Cependant, on doit éviter d'introduire plus de 100 c. c. de toxine, en une seule fois, dans la cavité péritonéale.

J'ai toujours fait usage d'une toxine ayant six jours d'étuve, c'est-à-dire provenant d'une culture où le bacille tétanique a poussé pendant 5 jours, les 24 premières heures étant nécessaires à la croissance du B. subtilis. Cette culture était filtrée sur la bougie Chamberland, sous faible pression; elle était passée sur un tamis avant d'être versée sur la bougie, pour retenir les débris du voile de *Bacillus subtilis.*

Le sérum des animaux immunisés comme nous venons de le dire, avec une toxine préparée au moyen des cultures mixtes de bacille tétanique et de *Bacillus subtilis,* est-il aussi antitoxique que celui obtenu avec la toxine des cultures tétaniques anaérobies? Les expériences suivantes répondent à la question; elles portent sur deux séries d'animaux : A. Animaux recevant le sérum avant la toxine; B. Animaux recevant la toxine avant le sérum.

A. *Le sérum est injecté avant la toxine.* — 1[re] *série.* — Cobayes de 400 à 500 grammes, reçoivent 1 c. c. de sérum sous la peau du flanc droit, 10, 20, 30, 40, 60 minutes et 1 h. 1/2 avant l'injection de 1/200 de c. c. de toxine dans la patte gauche.

Le témoin (450 gr.) meurt en 48 heures.

Tous les animaux traités prennent un tétanos local dont ils guérissent.

2[e] *série.* — Cobayes de 450 à 500 grammes, recevant sous la peau du flanc droit 3 c. c. de sérum, aux mêmes intervalles que ci-dessus, avant l'inoculation dans la patte gauche de 1/200 de c. c. de toxine.

Le témoin (400 gr.) meurt en 42 heures.

Les animaux ayant reçu la toxine moins d'une heure après le sérum, prennent un tétanos très léger, qui disparaît en 2 ou 3 jours.

3[e] *série.* — Cobayes de 450 à 500 grammes inoculés aux mêmes intervalles que ci-dessus, avec cette différence qu'ils reçoivent le sérum dans le péritoine. Aucun animal ne prend le tétanos.

Donc aucun animal ne prend le tétanos, s'il reçoit le sérum avant la toxine, y eut-il une heure et demie d'intervalle entre les deux inoculations. Ces résultats sont donc en concordance parfaite avec ceux que donne le sérum actuellement en usage.

B. *Toxine avant sérum.* — 1[re] *série.* — Cobayes de 350 à 450 grammes, recevant 1/200 de c. c. de toxine dans la patte gauche et 1 c. c. de sérum sous la peau du flanc droit un certain temps après : 25, 35, 40, 60 minutes, 1 h. 1/2, 2 h. 1/2, 3 heures, 6 heures, 12 et 14 heures.

Le témoin (500 gr.) meurt en 48 heures.

Tous les animaux prennent le tétanos (raideur de la patte, etc.) mais seuls survivent ceux qui ont reçu le sérum moins de 1 h. 1/2 après la toxine.

2[e] *série.* — Cobayes de 400 à 500 grammes recevant 1/200 de c. c. dans la patte gauche, puis 3 c. c. de sérum sous la peau du flanc droit, aux mêmes intervalles que ci-dessus.

Le témoin (465 gr.) meurt en 52 heures.

Tous les cobayes qui ont reçu le sérum moins de 2 h. 1/2 après la toxine sont préservés, les autres meurent avec des retards de 1 à 5 jours.

3e *série*. — Cobayes de 350 à 450 grammes ayant reçu 1/200 de c. c. de toxine à la patte gauche et 3 c. c. de sérum dans le péritoine, aux mêmes intervalles que ci-dessus.

Le témoin (450 grammes) meurt en 50 heures.

Tous les cobayes qui ont reçu le sérum moins de 3 heures après la toxine survivent. Ceux qui ont reçu le sérum 6 et 12 heures après, résistent plusieurs jours; quelques-uns même ne meurent pas.

Les effets du sérum sont donc très satisfaisants. Avec de fortes doses les résultats sont encore meilleurs.

Ainsi, un cobaye de 450 grammes ayant reçu sous la peau 6 c. c. de sérum 6 h. 1/2 après l'infection par 1/200 de c. c. de toxine a survécu. Il en a été de même pour un cobaye qui avait reçu la même dose dans le péritoine.

Enfin un cobaye de 400 grammes ayant reçu dans la patte gauche 1/200 de c. c. de toxine, a reçu, dans le péritoine, 14 heures plus tard, 12 c. c. de sérum, alors qu'il présentait déjà une gêne très évidente de la patte. Le tétanos suit son cours, paralysie de la patte gauche, puis de la droite, du train antérieur, etc. Le huitième jour je lui fais une injection de 5 c. c. de sérum. Peu à peu les phénomènes tétaniques s'amendent et aujourd'hui (6 mois après) l'animal est tout à fait bien portant.

Conclusion. — Les expériences précédentes permettent d'affirmer qu'avec la toxine obtenue par la culture à l'air libre du bacille de Nicolaier en symbiose avec le B. subtilis, on obtient un sérum tout aussi actif qu'avec la toxine obtenue par le procédé classique. Le nouveau procédé de culture peut donc être employé à la place de l'ancien pour la préparation du sérum anti-tétanique.

RECHERCHES SUR LES
MODES D'UTILISATION DU CARBONE TERNAIRE
PAR LES VÉGÉTAUX ET LES MICROBES

Par P. MAZÉ

TROISIÈME MÉMOIRE

Après avoir examiné de quelle façon l'*Eurotiopsis Gayoni* emprunte son carbone au sucre interverti et à l'alcool, il était tout indiqué de rechercher le mode d'assimilation de quelques autres aliments ternaires.

M. Laborde a montré que ce champignon se développe très bien lorsqu'on lui offre, comme unique aliment carboné, l'un des corps suivants : amidon, dextrine, maltose, lactose, galactose, mannite, glycérine, acide lactique, acide succinique, etc...

De tous ces composés, ce sont évidemment les trois derniers qui offrent le plus d'intérêt, car tous les autres passent par le stade alcool, bien qu'il soit quelquefois impossible de constater, au contact ou à l'abri de l'air, la formation intérimaire d'alcool.

Il en est ainsi, par exemple, de la mannite, et cependant, si l'on s'en rapporte aux résultats fournis par M. Laborde, on voit que les cultures développées aux dépens de la mannite conduisent aux mêmes chiffres que celles qui ont été alimentées avec du sucre interverti ou du dextrose, que l'on considère la vitesse du développement, le rendement, ou la valeur de la dépense d'entretien. Il faut en conclure que la mannite est utilisée de la même façon que le dextrose, avec cette différence que l'hydrogène d'une fonction alcoolique primaire ou secondaire doit être éliminé à l'état d'eau par fixation d'oxygène libre.

Les résultats relatifs à la glycérine ou à l'acide lactique semblent attester la mise en œuvre d'un processus d'assimilation différent de celui qui préside à l'incorporation du carbone des sucres.

La différence peut n'être qu'apparente; la glycérine, tout en

étant un homologue de la mannite, peut offrir une résistance plus grande à l'action de l'Eurotiopsis.

De même, l'acide lactique, grâce à sa fonction acide, impose au champignon des conditions de milieu différentes de celles que lui crée le liquide Raulin ordinaire.

Mais c'est à l'expérience à se prononcer sur ces questions, qui, en raison du rôle alimentaire de la glycérine et de la fréquence de l'acide lactique dans les fermentations microbiennes, présentent un intérêt général. Je commencerai par l'étude de la glycérine, en suivant le plan que j'ai déjà adopté dans le 2e mémoire.

II

Avant d'exposer les résultats des expériences, je dois faire quelques observations sur les caractères que présentent les cultures sur glycérine.

La culture originelle dont je me suis servi ne se développait pas sur milieu Raulin dans lequel on remplaçait le sucre par la glycérine. Pour obtenir des cultures à développement abondant et rapide, j'ai accoutumé l'Eurotiopsis à cet aliment pendant un an, par des passages successifs effectués au moyen de spores prélevées sur des cultures jeunes. Mais la sporulation était tout à fait irrégulière au début de mes essais; la culture était très peu abondante, le mycélium émergeait seulement le long des parois des vases, le voile ne se formait pas vers le centre, si mince que fût la couche liquide; au bout de plusieurs mois seulement j'ai pu obtenir un voile complet, mais très pauvre en spores et en filaments aériens. Ce n'est que lorsque ceux-ci se montrent en abondance sur toute la surface du voile, dans les quatre premiers jours qui suivent l'ensemencement, qu'on peut obtenir un développement rapide avec un rendement élevé; on peut, dans ces conditions, compter sur des résultats comparables. Tous ceux que j'ai rapportés dans ce mémoire ont été fournis par des cultures abondamment pourvues de filaments aériens qui portaient toujours de nombreuses conidies.

La glycérine a été employée à la dose de 5 0/0 en poids; mais on sait combien il est difficile de doser convenablement la

glycérine, c'est pour cela que je n'ai pas tablé sur le chiffre initial pour évaluer la quantité de glycérine consommée par les cultures. Ce chiffre a été déterminé de la façon suivante : on préparait un certain nombre de récipients qui recevaient tous le même volume de milieu de culture, on les stérilisait et on en ensemençait la moitié, le reste était conservé. Quand on arrêtait une culture, on dosait la glycérine à la fois dans le liquide de la culture et dans un récipient réservé ; la différence donnait la glycérine absorbée par le champignon. En soumettant ainsi les deux dosages simultanément au même traitement, on avait plus de chances d'obtenir des chiffres comparables ; la méthode que j'ai employée est celle de Pasteur ; le liquide Raulin s'y prête assez en raison de sa faible teneur en extraits.

Les expériences ont été faites dans les mêmes conditions et avec les mêmes appareils que celles que j'ai réalisées avec le sucre et l'alcool.

Voici maintenant les résultats obtenus dans des expériences disposées de façon à évaluer la quantité d'acide carbonique produit.

TABLEAU I

Nos d'ordre.	Durée de l'expérience jours.	Poids du mycélium. mgr.	Glycérine consommée. mgr.	Rendement rapporté à 100 de glycérine.	CO^2 dégagé. mgr.
1	8	413	1162,3	35,5	814,1
2	8	362,5	1185	30,6	900

Si l'on rapproche ces chiffres de ceux qui ont été fournis par les cultures sur milieu sucré (2e mémoire, tableau I), on voit qu'ils présentent respectivement entre eux les mêmes relations. Le rendement oscille au voisinage des mêmes valeurs, de même que la quantité d'acide carbonique dégagé rapportée au poids total de la culture ; il n'y a que la durée de l'expérience qui diffère, et cela grâce à la période de début qui est toujours plus difficile qu'avec le sucre.

D'après ces résultats, on peut prévoir déjà que l'assimilation de la glycérine s'effectue probablement de telle façon que le mycélium lui emprunte ses éléments dans le même rapport qu'au sucre, à savoir que la moitié de la molécule de glycérine est utilisée, pendant que l'autre est éliminée à l'état d'acide carbonique et d'eau. Mais avant de se prononcer sur le mécanisme

de ce dédoublement, il est prudent de s'entourer de nombreux renseignements, car la glycérine est susceptible de fournir les dérivés les plus variés.

Il est cependant vraisemblable que la première modification qu'elle subit, doit consister dans l'élimination de deux atomes d'hydrogène par voie d'oxydation, pour aboutir à un groupement aldéhydique ou cétonique. C'est d'ailleurs, comme je l'ai déjà fait remarquer, ce qui se passe avec la mannite.

L'oxygène emprunté à l'atmosphère en vue de cette transformation sera donc en excès sur la quantité exigée pour l'incorporation du carbone du sucre, lequel se dédouble sans oxydation préalable, pourvu, toutefois, que la dislocation que subit le produit dérivé soit de même nature que celle qui aboutit à la formation de l'alcool et de l'acide carbonique aux dépens des hexoses.

Si, par conséquent, on a constaté dans les éléments du tableau I un parallélisme assez étroit avec les chiffres fournis par les cultures sur milieu sucré, cette concordance n'existera plus dès que l'on fera intervenir l'oxygène absorbé.

Voici, en effet, les résultats fournis par les cultures sur milieu glycériné, en atmosphère confinée. Le tableau II donne les chiffres définitifs de l'expérience; le tableau III renferme les éléments qui ont permis de les calculer. Les volumes de gaz sont ramenés à la pression de 760 et à la température de 0°.

TABLEAU II

Poids du mycélium	mgr.	156,5
Durée de l'expérience	jours.	4
Glycérine consommée	mgr.	409,4
CO^2 dégagé en volume	c. c.	132,1
— en poids	mgr.	249,77
— par unité de poids et de temps		0,42
O. consommé en volume	c. c.	158,4
— en poids	mgr.	226,54
— par unité de poids et de temps		0,36
Rapport $\frac{CO^2}{O}$ en volume		0,83

TABLEAU III

Volume d'air initial		c. c.	833,6
— final		—	807,4
Composition centésimale de l'atmosphère.	Azote		81,57
	Oxygène		2,07
	CO^2		16,36
Composition absolue.	Az	c. c.	684,3
	O	—	17,2
	CO^2	—	132,1

La tableau III n'appelle aucune observation en dehors de celles que j'ai faites dans le 2e mémoire à propos du tableau correspondant, si ce n'est que l'atmosphère confinée ne renfermait pas d'hydrogène.

Le tableau II nous fournit le renseignement cherché; le quotient respiratoire est 0,83, il tient à peu près le milieu entre les chiffres 1,17 et 0,508 fournis respectivement par le sucre et l'alcool; cela prouve qu'il y a un excédent d'oxygène absorbé à mettre à l'actif de la glycérine, si on met en parallèle les chiffres 0,83 et 1,17; l'excédent est en faveur de l'alcool si on compare les chiffres 0,83 et 0,508. Ce résultat est conforme au fait prévu, à savoir que la glycérine perd deux atomes d'hydrogène pour donner de l'eau par fixation d'oxygène libre; comme on connaît le poids de glycérine consommée, on peut déterminer le volume d'oxygène qui a été absorbé par cette transformation. Le calcul donne 50 c. c. Ceci va nous permettre de calculer d'autre part le quotient respiratoire fictif qui correspondrait à une culture d'Eurotiopsis faite avec de l'aldéhyde glycérique, ou de la dioxyacétone. Le rapport qui correspond à ces deux composés, tous deux possibles, est :

$$\frac{132,1}{158,4\text{-}50} = 1,2.$$

Ce chiffre est, comme on le voit, suffisamment voisin de 1,17 pour nous permettre, avec l'aide des renseignements fournis par le tableau I, de conclure que le mécanisme de l'assimilation de la glycérine comporte les stades suivants :

(1) $CH^2OH - CHOH - CH^2OH + O =$
$CH^2OH - CHOH - CHO$ ou $CH^2OH - CO - CH^2OH + H^2O.$

(2) $CH^2OH - CHOH - CHO = CH^3 - CH^2OH + CO^2.$

Mais l'expérience ne permet pas d'opter entre les dérivés cétonique ou aldéhydique de la glycérine. Comme M. Laborde l'a montré, il est impossible de mettre en évidence les produits de dégradation de la glycérine par l'Eurotiopsis : soit en immergeant le mycélium jeune tout en laissant libre accès à l'air dans les récipients de culture, soit en lui imposant des conditions d'anaérobiose complète, il n'y a jamais ni production de corps

réducteurs dérivés de la glycérine, ni fermentation avec mise en liberté d'hydrogène.

Malgré cette absence de preuve expérimentale directe, on n'en est pas moins fondé à conclure, abstraction faite de la formation préalable d'une molécule d'eau par molécule de glycérine consommée, que l'assimilation de cet aliment se fait suivant le même processus que celle du dextrose, ainsi qu'en témoignent tous les faits exposés jusqu'ici.

On connaît, d'ailleurs, beaucoup de microbes qui permettent de suivre l'un ou l'autre des modes de dégradations (1) et (2). Il n'y a donc là rien de neuf.

Dans le tableau II, j'ai fait figurer, comme pour le sucre et l'alcool, les chiffres relatifs au dégagement d'acide carbonique ou à l'absorption d'oxygène par unité de poids de mycélium dans l'unité de temps; mais ces chiffres se prêtent aux critiques formulées dans le 2e mémoire et pour les mêmes raisons.

Pour traduire avec une précision suffisante la valeur des dépenses de construction et d'entretien, nous allons encore avoir recours à la formule de M. Duclaux. Mais auparavant, il faut déterminer par l'expérience le poids moyen des cultures.

Le tableau IV renferme les chiffres fournis par une série d'expériences réalisées dans ce but, en prenant toutes les précautions indiquées dans le 2e mémoire pour obtenir des cultures comparables. Chaque culture était faite avec 21 c. c. de glycérine à 5 0/0 placés dans des vases coniques de 250 c. c.

TABLEAU IV

Nos d'ordre.	Durée des cultures. jours et heures.	Poids du mycélium. mgr.	Glycérine consommée. mgr.	Rendement p. 100 de glycérine consommée.
1	2 j. 15 h.	7,3	—	—
2	3 —	11,4	—	—
3	3 — 15 —	28,6	44,7	—
4	4 —	35,5	—	—
5	4 — 16 —	72,9	171,6	42,4
6	5 — 16 —	175,8	—	—
7	6 — 16 —	215,2	621,4	34.6
8	7 — 16 —	266,2	852	31,2
9	8 — 16 —	288,9	979	29,5

Pour calculer le poids moyen de ces cultures, il suffit de construire la courbe du développement dans le temps; on obtient

ainsi, en portant les temps sur la ligne des abscisses et les poids du mycélium en ordonnées, la courbe figure 1.

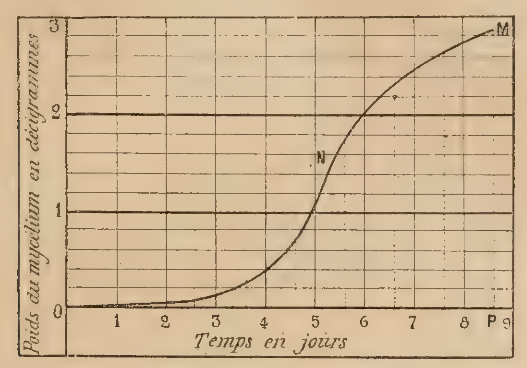


Fig. 1 — Développement de l'Eurotiopsis sur milieu glyceriné.

En appliquant la méthode de Simpson au calcul des aires des différentes portions de courbe définies par les cultures du tableau IV, on obtient la hauteur des rectangles équivalents; cette hauteur représente le poids moyen des cultures: si on l'exprime en fonction de l'ordonnée maximum correspondante, on obtient les valeurs des coefficients $1/n$ de la formule (3). Ces valeurs sont les suivantes (tableau V); les numéros des cultures sont empruntés au tableau IV.

TABLEAU V

Nos des cultures.	Valeurs de $\frac{1}{n}$.
5	0.10
6	0.197
7	0.26
8	0,324
9	0,37

Ces chiffres montrent que la valeur du poids moyen est une quantité variable qui augmente rapidement avec le temps, pourvu, bien entendu, que les cultures soient arrêtées au moment où il y a encore des aliments non consommés. La loi du développement des cultures en présence de la glycérine n'est pas encore une fonction parabolique. On remarque, en outre, que ces chiffres varient entre les mêmes limites, à peu près, que les chiffres correspondants fournis par les cultures sur

milieu sucré. Il en est de même de ceux qui expriment le rendement (courbe fig. 2); cette courbe a été construiteen portant en abscisses les quantités de glycérine consommée, et en ordonnées les poids de mycélium correspondants. Le rendement est exprimé par le rapport d'une ordonnée à l'abscisse correspondante.

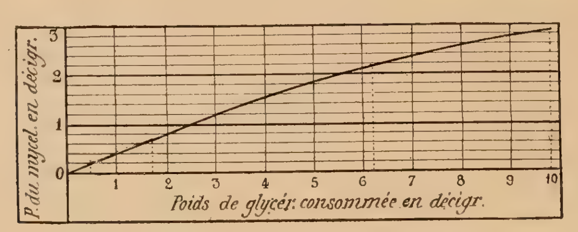


Fig. 2. — Courbe du rendement (milieu glycériné).

Pour calculer avec ces données la valeur de la dépense d'entretien suivant l'âge des cultures, il suffit de remplacer dans la formule connue (3) les valeurs de P fournies par l'expérience, et celles de $1/n$ consignées au tableau V.

$$S = aP + \frac{1}{n} P\, b\, t. \qquad (3)$$

Je rappelle pour mémoire que S représente le poids d'aliment ternaire consommé; a un coefficient auquel les expériences rapportées dans le cours de ce mémoire assignent la valeur 2; b la dépense d'entretien moyenne par unité de poids de mycélium et par unité de temps; t la durée de la culture.

Cette formule peut être appliquée de deux façons différentes, suivant que l'on rapporte les constantes a et b à la molécule entière de glycérine, ou que l'on ne considère que la portion de molécule réellement utilisée, laquelle n'est autre que l'aldéhyde éthylique.

On a donc le choix entre les deux formules suivantes :

$$S = 2P + \frac{1}{n} P\, b\, t, \qquad (4)$$

$$\frac{S}{2} = P + \frac{1}{n} P\, b\, t. \qquad (5)$$

J'emploierai la formule (5) qui fournit des valeurs de b deux

fois plus faibles que la formule (4); mais elle a l'avantage de ne tenir compte que de la fraction de molécule de glycérine incorporée; c'est d'ailleurs celle que j'ai déjà utilisée dans le cas du sucre.

En effectuant les calculs, on obtient pour b les valeurs suivantes, relatives aux cultures désignés, dans le tableau V.

TABLEAU VI

Nos des cultures	Valeurs de b.
5	0,38
7	0,256
8	0,241
9	0,22

Ces valeurs sont décroissantes, comme celles qui ont été fournies par les cultures sur milieu sucré. Elles expriment la dépense moyenne d'entretien pour les différentes cultures, ou pour une même culture à différents stades de son développement; or, une culture se compose de cellules jeunes et de cellules vieilles ; comme la dépense d'entretien diminue à mesure qu'augmente la proportion de ces dernières, il faut en conclure que le mycélium d'Eurotiopsis perd rapidement la faculté de se nourrir de glycérine même en présence d'un grand excès d'aliment. L'étude de l'alimentation sucrée nous a conduit à la même conclusion : j'ai attribué le fait à la destruction de la zymase par voix d'oxydation. Le phénomène est plus complexe lorsqu'il s'agit de la glycérine, car l'action dédoublante est précédée d'une action oxydante ; si cette dernière exige des conditions qui gênent la première, on comprend que le vieillissement des cellules nourries avec de la glycérine soit encore plus rapide que dans le cas où on leur offre du sucre interverti. De là la diminution de la vitesse d'accroissement du poids des cultures et la faible élévation de la dépense d'entretien, car on ne saurait interpréter d'une autre manière les différences que présentent les cultures sur milieu glycériné avec celles qui se développent sur milieu sucré, puisque l'expérience prouve que les transformations ultérieures que subissent les deux aliments se confondent.

J'aurais pu montrer que le vieillissement des cellules se traduit dans le cas de l'alimentation glycérinée par une augmentation des matières cellulosiques et des produits saccharifiables; je me suis borné à établir qu'il n'y a pas de production de

glycogène, ou, d'une manière plus générale, transformation de la glycérine en hexoses, avant son assimilation.

Pour le démontrer, j'ai placé une culture bien développée, pesant environ 2 gr. 5 à l'état sec, dans des conditions d'anaérobiose complète : on n'observe aucun dégagement gazeux. La pression à l'intérieur des ballons ne varie pas si longtemps qu'on laisse les choses en l'état; cela prouve que le mycélium ne renferme aucune substance capable de se dédoubler en alcool et acide carbonique, et que, par conséquent, la glycérine n'est pas non plus mise en réserve à l'état de glycogène.

Il faut en conclure que le processus d'assimilation de la glycérine est bien celui que j'ai indiqué, bien qu'il soit impossible de provoquer l'accumulation des substances intérimaires dans les liquides de culture.

L'étude du rendement, celle des échanges gazeux, l'évaluation de la dépense moyenne d'entretien, constituent un ensemble d'arguments suffisants pour appuyer cette conclusion qui peut seule s'accorder avec les faits expérimentaux.

III

L'acide lactique est un aliment pour l'Eurotiopsis; l'accoutumance à l'acide lactique du mycélium cultivé sur milieu Raulin ordinaire se fait très facilement; deux ou trois passages suffisent pour obtenir des cultures abondantes ; mais il faut, comme toujours, prendre la précaution de n'employer qu'une très faible épaisseur de liquide. L'Eurotiopsis peut se développer très bien en présence de 5 0/0 d'acide lactique inactif en volume. Les filaments aériens restent courts; mais l'aptitude à la production des conidies devient très grande; le mycélium se couvre d'une couche abondante de spores qui donnent au voile un aspect farineux.

Pour étudier l'assimilation de l'acide lactique, j'ai réalisé les expériences que j'ai déjà décrites assez souvent pour qu'il soit inutile d'y revenir. Je me contenterai donc d'exposer les résultats qu'elles ont fournis.

TABLEAU VII

Nos d'ordre.	Durée de l'expérience. jours.	Poids du mycélium. mgr.	Acide lactique consommé. mgr.	Rendement rapporté à 100 d'acide lactique.	CO^2 dégagé. mgr.
1	8	192,2	871,4	22	848
2	8	201	832,7	24,1	822

TABLEAU VIII

CULTURE EN ATMOSPHÈRE CONFINÉE

Poids du mycélium	mgr.	85.8
Durée de l'expérience	jours.	4,29
Acide lactique consommé	mgr.	309,8
CO^2 dégagé en poids	—	320,76
— en volume	c. c.	163,12
O absorbé en poids	mgr.	222,42
— en volume	c. c.	151,7
Rapport $\frac{CO^2}{O}$ en volume		1,07

TABLEAU IX

ÉLÉMENTS UTILISÉS DANS LE CALCUL DU TABLEAU VIII

Volume d'air initial		c. c.	827,7
Volume d'air final		—	839,1
Composition centésimale de l'atmosphère.	Azote		77.93
	O		2,63
	CO^2		19,44
Composition absolue.	Az	c. c.	653,92
	O	—	22,0[illegible]
	CO^2	—	163,12

TABLEAU X

DÉVELOPPEMENT DE L'EUROTIOPSIS SUR MILIEU LACTIQUE A 6 0/0 EN POIDS

Nos d'ordre des cultures.	Durée des cultures. jours et heures.	Poids du mycélium. mgr.	Acide lactique consommé. mgr.	Rendement p. 100 d'acide lactique consommé.
1	2 j. 15 h.	16,8	75,6	22,3
2	3 —	22,2	100,8	21,9
3	3 — 15 —	84,6	385,6	21,4
4	4 — 16 —	164,7	768,4	21,7
5	5 — 16 —	219,1	1007	21,6
6	6 — 16 —	257,6	1187,8	21

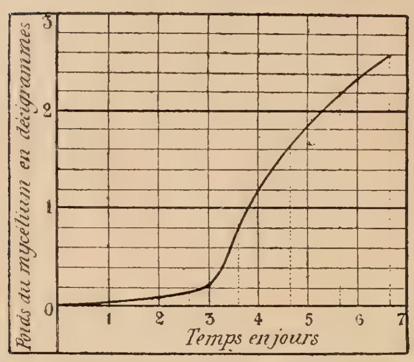


Fig. 3. — Développement de l'Eurotiopsis sur milieu lactique.

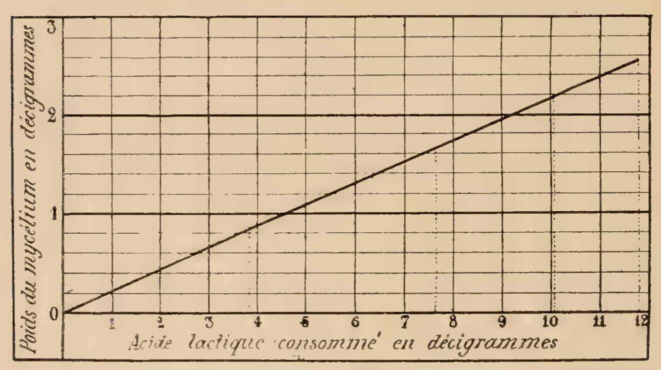


Fig 4. — Courbe du rendement (milieu lactique). (La longueur des ordonnées a été multipliée par 2 pour raison de symétrie.)

TABLEAU XI

VALEURS DU RAPPORT $\frac{1}{n}$ DU POIDS MOYEN AU POIDS FINAL DES CULTURES, TIRÉES DE LA COURBE FIG. 3

Nos des cultures (les mêmes qu'au tableau IX.	Valeurs de $\frac{1}{n}$.
3	0,185
4	0,226
5	0,300
6	0,356

TABLEAU XII

VALEURS DE b (DÉPENSE MOYENNE D'ENTRETIEN) TIRÉES DE LA FORMULE (3)

Nos des cultures.	Valeurs de b.
3	1,91
4	1,26
5	0,76
6	0,55

Le tableau VII met deux faits en évidence : la faiblesse du rendement, et la proportion élevée d'acide carbonique dégagé; ces résultats s'écartent nettement de ceux qu'on a obtenus avec les autres substances alimentaires étudiées ; l'impression qui s'en dégage est que le mode d'utilisation de l'acide lactique diffère de celui qu'on a observé avec le sucre, l'alcool et la glycérine.

Mais le tableau VIII nous ramène à d'autres idées ; si le dégagement d'acide carbonique est abondant, l'absorption d'oxygène est aussi très active; la valeur du quotient respiratoire est 1,07, chiffre suffisamment rapproché de 1,17 pour nous permettre de conclure que le mécanisme de l'assimilation de l'acide lactique doit être rapproché de celui des sucres.

Ce corps a d'ailleurs la même composition centésimale que les hexoses, et il présente avec eux un rapport physiologique étroit, puisqu'il peut en dériver, sans perte de matière, par voie de dédoublement diastasique très probablement, bien que le fait n'ait pas encore été démontré expérimentalement.

Ses fonctions chimiques imposent cependant aux microbes qui s'en nourrissent des conditions de vie tellement différentes de celles que leur constituent les substances neutres, comme les sucres et les alcools, qu'on n'a pas le droit de s'étonner de voir s'exalter ou s'atténuer en sa présence certaines fonctions physiologiques; c'est à cette cause qu'il faut rapporter l'activité si grande des échanges gazeux, entre le mycélium et l'air, lorsqu'on cultive l'Eurotiopsis sur un milieu renfermant 6 0/0 d'acide lactique.

L'exaltation des phénomènes de combustion en présence d'acide lactique entraîne un certain nombre de conséquences dont les tableaux X et XII traduisent le sens et la valeur.

C'est ainsi que le rendement, comme je l'ai déjà fait remarquer, est extrêmement faible, eu égard aux chiffres que le sucre interverti, l'alcool et la glycérine nous ont fournis; ce qui est remarquable aussi, c'est sa constance, mais cette particularité est due à l'intervention d'une autre cause : le vieillissement rapide des cultures. Tout se passe comme si le mycélium perdait en très peu de temps, peut-être en quelques heures, le pouvoir de se nourrir d'acide lactique; ce résultat est inscrit sous une forme un peu plus parlante dans les chiffres du tableau XII, qui

donne les valeurs de b, c'est-à-dire la dépense moyenne d'entretien suivant l'âge des cultures, calculée en considérant l'alcool comme la fraction utilisable de l'acide lactique. Ainsi, pendant que le poids de la culture varie du simple au triple, la dépense moyenne d'entretien suit une progression inverse. Pour qu'il en soit ainsi, il faut admettre que la formation d'une nouvelle cellule est accompagnée de la mort d'une autre, la mort étant définie, dans ce cas particulier, par la perte de la faculté de se servir de l'acide lactique comme aliment. On s'explique de cette façon que le rendement demeure à peu près constant, et que la courbe figure 4 soit représentée par une droite, à très peu de chose près, jusqu'à la destruction complète de l'acide lactique.

Tous ces faits concordent donc à montrer que l'utilisation de l'acide lactique se fait suivant l'un des processus suivants :

$$(4) \quad \begin{cases} C^3H^6O^3 = CH^3 - CH^2OH + CO^2 \\ CH^3 - CH^2OH + O = CH^3 - CHO + H^2O. \end{cases}$$

$$(5) \quad C^3H^6O^3 + O = CH^3 - CHO + H^2O.$$

Les deux conduisent au même résultat, et sont compatibles avec les données précédentes fournies par l'expérience ; mais au point de vue physiologique, il y a entre eux une différence considérable.

La première transformation n'aurait pas encore été observée, du moins à ma connaissance. La seconde est connue depuis longtemps des chimistes et s'obtient par l'électrolyse de l'acide lactique, ou par l'action à chaud du bioxyde de plomb ou du permanganate de potassium en présence d'acide sulfurique.

On se trouve ainsi conduit à établir expérimentalement le dédoublement de l'acide lactique en alcool et acide carbonique, ou à obtenir sa transformation en aldéhyde par voie d'oxydation par l'intermédiaire du mycélium.

Il y a beaucoup d'observations en microbiologie qui tendent à donner à la première transformation une certaine vraisemblance, sinon un peu de probabilité. Un grand nombre de ferments lactiques proprement dits produisent, à côté de l'acide lactique, une quantité plus ou moins grande d'alcool. D'autres microbes, qui dans certaines conditions produisent des quantités assez élevées d'acide lactique, donnent naissance à de

l'alcool éthylique; ce sont, parmi les plus connus : les pneumocoques de Friedlander et le ferment mannitique de Gayon. Ces deux composés peuvent provenir du sucre indépendamment l'un de l'autre, mais il n'est pas invraisemblable que le second dérive du premier.

L'expérience montre que le mycélium jeune d'*Eurotiopsis Gayoni* développé sur milieu minéral additionné de 6 0/0 d'acide lactique produit de petites quantités d'alcool lorsqu'on le submerge dans des solutions d'acide lactique dont la concentration varie de 1 à 5 0/0. Les résultats relatifs à cette question seront exposés dans un autre mémoire; je me contenterai d'ajouter ici que l'on ne peut pas rapporter cet alcool à des matières hydrocarbonées qui subiraient une simplification lente dans les conditions de l'expérience, pour aboutir en dernier lieu à la production d'alcool sous l'influence de la zymase.

On constate également la présence de quantités sensibles d'aldéhyde éthylique; mais on ne peut pas admettre que ce composé résulte directement du dédoublement de l'acide lactique par un mécanisme d'oxydation suivant la transformation (5). La présence d'alcool libre rattache le mécanisme d'assimilation de cet aliment aux transformations (4).

Les renseignements consignés par le tableau XII sont d'ailleurs conformes à ces résultats : on a vu en effet dans le 2e mémoire que la valeur de la dépense d'entretien chez le mycélium développé sur milieu alcoolisé va en croissant jusqu'à l'épuisement complet de l'aliment ternaire, dans les conditions où je me suis placé. Ce fait caractérise un processus d'assimilation qui ne fait intervenir qu'une diastase oxydante ; il se distingue en effet complètement de celui qui préside à l'incorporation du carbone du sucre interverti ou de la glycérine, lequel exige, comme nous l'avons vu, l'intervention de diastases dédoublantes à côté de celle qui doit fixer l'oxygène atmosphérique sur l'alcool; avec la glycérine et le sucre, la dépense moyenne d'entretien diminue régulièrement du commencement à la fin de la culture ; ce caractère est encore plus accentué avec l'acide lactique, ce qui montre bien que son dédoublement n'est pas dû uniquement à un phénomène d'oxydation.

Dans le 2e mémoire, j'ai utilisé dans mes démonstrations un autre ordre de faits qui se présentent plutôt comme la con-

clusion des résultats enregistrés dans les expériences antérieures : ce sont ceux qui ont trait à la composition élémentaire du mycélium. Ils peuvent jouer ici le même rôle, et on peut même ajouter que le champignon développé sur milieu glycériné ou lactique doit présenter la même composition centésimale que celui qui a poussé sur milieu sucré ou alcoolisé, à condition de le prendre à des états aussi comparables que possible.

C'est ce que montrent les chiffres du tableau suivant :

TABLEAU XIII

	Glycérine Culture n° 1. Tableau I.	Acide lactique Culture n° 2. Tableau VII.
C	48,89	51,51
H	7,1	7,24
Az	4,67	4,73
O + S	39,34	36,52

Ces chiffres doivent être rapprochés de ceux des colonnes 2 et 3, tableau XIV, 2e mémoire ; on voit qu'ils présentent avec ces derniers des rapports assez étroits.

Je n'ai pas cherché à établir, par l'analyse, les variations qui se produisent dans la composition élémentaire, suivant l'âge des cultures, du mycélium développé aux dépens de la glycérine ou de l'acide lactique. Il est à peu près évident qu'elles sont de même nature que celles qui ont été exposées dans le 2e mémoire, c'est-à-dire que le vieillissement des cultures a pour conséquence un enrichissement du mycélium en oxygène et un appauvrissement en carbone, hydrogène et azote.

IV

CONCLUSIONS

Deux conclusions se dégagent des recherches que j'ai exposées dans le cours du 2e et du 3e mémoire.

1° Les phénomènes de digestion qui préparent l'incorporation du carbone ternaire à la substance vivante varient suivant la nature de l'aliment offert aux champignons ;

2° La composition élémentaire du mycélium est constante pour les quatre aliments étudiés, si on le prend à un état de développement à peu près comparable dans tous les cas.

Les sucres, l'alcool, la glycérine, l'acide lactique se rédui-

sent avec plus ou moins de déchets à l'aldéhyde qui constitue la portion utilisée de chacun de ces aliments, d'où la variation dans le processus de digestion. Le mycélium nourri avec des composés tout à fait différents n'utilise donc en définitive qu'une même substance, d'où la constance dans la composition centésimale.

L'Eurotiopsis peut se développer aux dépens d'autres matières ternaires, telles que l'acide succinique, l'acide acétique, qui ne semblent pas se prêter aussi facilement à la production d'aldéhyde éthylique; il serait intéressant de voir jusqu'à quel point le travail de la digestion se rapproche de ce but, et par conséquent de se rendre compte du degré de généralité des conclusions précédentes appliquées seulement aux aliments ternaires.

M. Laborde a montré que l'Eurotiopsis peut emprunter son azote aux composés les plus variés; les résultats qu'il a obtenus avec les matières albuminoïdes prouvent qu'une fraction importante de leur carbone contribue, à côté de leur azote, à l'édification des substances vivantes; c'est dire qu'une même cellule peut emprunter ses éléments constituants à diverses sources alimentaires et, sans doute, suivant des mécanismes très variés.

Le déchet éliminé par l'Eurotiopsis pendant le travail de la digestion, se traduit pour les sucres, l'alcool, la glycérine et l'acide lactique par une production d'acide carbonique et d'eau; le quotient respiratoire est donc une fonction de ce déchet et les variations de celui-là peuvent être prévues dans une certaine mesure par la nature de celui-ci; on a vu jusqu'à quel point ce fait s'est vérifié dans le cours de ce travail.

Mais je dois faire remarquer que la valeur du quotient respiratoire n'est pas une quantité constante; elle varie pour un même aliment suivant l'âge des cultures. Ce fait, que je n'ai pas vérifié directement, découle de la composition élémentaire du mycélium à diverses époques de son développement; on a vu en effet qu'il s'enrichit en oxygène; le quotient respiratoire qui est 1,2 à peu près, tout à fait au début de la culture, dans le cas de l'alimentation hydrocarbonée, doit décroître peu à peu et tendre vers l'unité.

Les résultats inscrits au tableau V, 2e mémoire, permettent de dissocier les deux sources de production d'acide carbonique ou d'absorption d'oxygène dont la résultante s'exprime par le quotient respiratoire.

La plus importante, du moins dans le cas de l'alimentation hydrocarbonée, est celle qui représente les résidus du travail de digestion; l'équation suivante permet de les calculer :

$$C^6H^{12}O^6 + 2O = 2C^2H^4O + 2CO^2 + 2H^2O.$$

Il y a deux molécules de CO^2 dégagé pour une d'O absorbé, le rapport $\frac{CO^2}{O}$ fourni par cette double transformation est donc égal à 2.

L'autre source de CO^2 a son origine dans les combustions qui se produisent au sein des substances vivantes. Le tableau V nous fournit tous les éléments nécessaires à l'évaluation des deux termes du rapport $\frac{CO^2}{O}$ résultant de ces combustions.

Il y a eu, en effet, dans l'expérience visée, 630 milligrammes de sucre consommé, lesquels ont absorbé 112 milligrammes d'oxygène et dégagé 308 milligrammes d'acide carbonique pour se transformer en aldéhyde. Les différences entre ces chiffres et les quantités totales de CO^2 éliminé et d'O consommé expriment la part qui revient aux combustions des substances vivantes. En faisant le rapport de leur volume, on trouve comme quotient 0,70; c'est la valeur qu'on aurait obtenue si on avait pu faire absorber l'aldéhyde au champignon, comme unique aliment carboné; mais l'Eurotiopsis ne se développe pas en présence de l'aldéhyde même à dose très faible.

Il est évident que si l'on effectue le même calcul sur les chiffres fournis par les expériences analogues réalisées avec la glycérine et l'acide lactique, on doit retrouver un chiffre relativement voisin de 0,70.

La vérification fournit le chiffre 0,55 pour la glycérine, et 0,70 pour l'acide lactique.

Mais à côté de ces faits concordants, il ne faut pas oublier les différences qu'on a relevées, et qui ne manquent pas d'intérêt, je veux parler de l'intensité relative des échanges gazeux suivant la nature des aliments ou l'âge des cultures ; mais ces faits semblent relever dans une certaine mesure de la destruction de la zymase ou des autres diastases que le mycélium met en œuvre dans la dislocation préalable des aliments qu'il incorpore à sa substance ; leur interprétation se trouvera donc mieux à sa place à la suite de l'étude des conditions de la formation et de

la destruction de la zymasé, que j'aborderai dans le mémoire suivant.

Il me reste encore à rappeler la conclusion la plus naturelle du 2e et du 3e mémoire, celle qui y a été particulièrement visée : c'est que l'Eurotiopsis, qui fait fermenter le sucre avec une énergie comparable à celle de la levure, est en même temps capable d'assimiler tous les produits de la fermentation alcoolique : alcool, glycérine, acide succinique. M. Laborde l'avait déjà établi ; mon but consistait surtout à montrer que là où on constate seulement la disparition du sucre et la production corrélative de substance vivante, il y a malgré tout production d'alcool, d'aldéhyde et peut-être d'acide lactique ; en d'autres termes, si les produits des fermentations s'accumulent dans les tissus d'un végétal, ou dans le milieu ambiant, ce n'est pas parce qu'ils forment des résidus inutilisables, mais bien parce que l'être vivant est placé dans des conditions qui l'empêchent de tirer parti du travail qu'il accomplit.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1901

PAR M. EUGÈNE VIALA

Préparateur au service antirabique.

I

Pendant l'année 1901, 1,321 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur : 8 sont mortes de la rage; chez 3 d'entre elles, la rage s'est déclarée avant la fin du traitement; ces 3 personnes ne seront pas comptées parmi les traitées.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	1.318
Morts	5
Mortalité 0/0	0,38

Dans le tableau suivant, ces chiffres sont rapprochés de ceux fournis par les statistiques des années précédentes.

Années.	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité 0/0.
1886	2.671	25	0,94
1887	1.770	14	0,79
1888	1.622	9	0,55
1889	1.830	7	0,38
1890	1.540	5	0,32
1891	1.559	4	0,25
1892	1.790	4	0,22
1893	1.648	6	0,36
1894	1.387	7	0,50
1895	1.520	5	0,33
1896	1.308	4	0,30
1897	1.521	6	0,39
1898	1.465	3	0,20
1899	1.614	4	0,25
1900	1.420	4	0,28
1901	1.321	5	0,38

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1901.

	MORSURES à la tête.			MORSURES aux mains.			MORSURES aux membres.			TOTAUX		
	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.
Tableau A.....	20	0	0	93	0	0	38	0	0	171	0	0
Tableau B.....	80	0	0	521	4	0,77	184	0	0	785	4	0,51
Tableau C.....	23	1	4,34	186	0	0	153	0	0	362	1	0,27
	123	1	0,79	800	4	0,30	395	0	0	1318	5	0,38

III

Au point de vue de leur nationalité, les 1,318 personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Amérique	1
Belgique	1
Bulgarie	2
Grèce	1
Italie	1
Irlande	3

Soit 9 étrangers et 1,309 Français.

Voici la répartition par départements des 1,309 Français.

Il ne faut pas oublier, dans la comparaison avec les tableaux antérieurs, que cinq Instituts antirabiques fonctionnent aujourd'hui qui n'existaient pas autrefois : Lille, Marseille, Montpellier, Lyon et Bordeaux drainent les mordus dans la région environnante.

Ain	1	Finistère	12	Oise	15
Aisne	4	Gard	3	Oran	0
Allier	9	Garonne (Haute-)	0	Orne	7
Alpes (Basses-)	0	Gers	13	Pas-de-Calais	3
Alpes (Hautes-)	0	Gironde	0	Puy-de-Dôme	19
Alpes (Maritimes-)	0	Hérault	0	Pyrénées (Basses-)	10
Alger	0	Ille-et-Vilaine	16	Pyrénées (Hautes-)	2
Ardèche	0	Indre	27	Pyrénées-Orientales	0
Ardennes	0	Indre-et-Loire	3	Rhin (Haut-)	0
Ariège	0	Isère	1	Rhône	0
Aube	3	Jura	2	Saône (Haute-)	2
Aude	0	Landes	12	Saône-et-Loire	6
Aveyron	17	Loir-et-Cher	0	Sarthe	13
Bouches-du-Rhône	0	Loire	0	Savoie	0
Calvados	9	Loire (Haute-)	9	Savoie (Haute-)	2
Cantal	4	Loire-Inférieure	4	Seine	623
Charente	11	Loiret	0	Seine-et-Marne	7
Charente-Inférieure	20	Lot	28	Seine-et-Oise	120
Cher	14	Lot-et-Garonne	8	Seine-Inférieure	5
Constantine	0	Lozère	7	Sèvres (Deux)	8
Corrèze	10	Maine-et-Loire	10	Somme	11
Corse	0	Manche	13	Tarn	2
Côte-d'Or	5	Marne	0	Tarn-et-Garonne	6
Côtes-du-Nord	30	Marne (Haute-)	2	Var	0
Creuse	22	Mayenne	7	Vaucluse	0
Dordogne	30	Meurthe-et-Moselle	3	Vendée	13
Doubs	3	Meuse	0	Vienne	9
Drôme	0	Morbihan	4	Vienne (Haute-)	12
Eure	3	Nièvre	2	Vosges	3
Eure-et-Loir	0	Nord	0	Yonne	0

PERSONNES PRISES DE RAGE EN COURS DE TRAITEMENT

Mme HARDIVILLER Berthilde, 47 ans, demeurant rue des Carrières à Suresnes.

Mordue le 12 février à la lèvre supérieure, côté droit; morsure pénétrante et déchirure nécessitant un point de suture; non cautérisée. La tête du chien a été remise à l'Institut Pasteur et le bulbe, inoculé le 16 février à un lapin, a donné la rage le 15 mars. Mme Hardiviller a été traitée à l'Institut Pasteur du 14 février au 6 mars; les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle les derniers jours de son traitement. Morte le 10 mars.

Le même chien a mordu 2 autres personnes, qui ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur, et qui se portent bien.

HEISSAT Émile, 29 ans, demeurant à Londronde (Vendée). Mordu le 24 janvier, lèvre supérieure 3 cicatrices, menton côté

droit 1 cicatrice; mordu par un chien dont la tête a été envoyée à l'Institut Pasteur, et le bulbe, inoculé le 26 janvier à un lapin, a donné la rage le 17 février. Un cheval mordu en même temps que Heissat a été pris de rage le 24 février.

Traité du 20 février au 10 mars. Heissat est mort à l'hôpital Pasteur le 10 mars, il était malade depuis plusieurs jours. Son bulbe, inoculé à 2 lapins, a donné la rage 24 jours après.

DENIS Henri, 4 ans, demeurant chez son père, rue des Fontaines, 17, à Paris. Mordu le 21 septembre, joue droite une éraillure faite par la dent du chien et léchée ensuite par ce même chien. La plaie a été lavée au vinaigre. Traité du 23 septembre au 13 octobre; les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 13 octobre. Mort le 17 octobre.

Le chien avait été reconnu enragé par un vétérinaire.

PERSONNES TRAITÉES, MORTES DE RAGE APRÈS LE TRAITEMENT

AUPETIT Henri, 62 ans, 102, rue de Clignancourt, à Paris. Mordu le 21 juin au pouce gauche, par un chien reconnu enragé par un vétérinaire, 1 morsure pénétrante qui a saigné, La blessure a été lavée au vinaigre de suite après.

Aupetit a été traité à l'Institut Pasteur du 24 juin au 11 juillet. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 5 août. Mort le 6 août à l'hôpital Lariboisière.

JEUNEHOMME Albert, 30 ans, 14, passage Parmentier, à Paris. Mordu le 15 juillet 1901, aux deux mains; plusieurs morsures dont deux très profondes ont saigné beaucoup. Chien reconnu enragé par un vétérinaire. Plaie non cautérisées.

Jeunehomme a été traité à l'Institut Pasteur du 16 juillet au 2 août. Entré à l'hôpital Lariboisière le 24 avril 1902, présentant des symptômes rabiques, mort le jour même. Son bulbe, envoyé à l'Institut Pasteur, a été inoculé le 29 avril à 2 lapins qui n'ont encore donné aucun résultat. Cinq autres personnes mordues par le même chien et traitées à l'Institut Pasteur se portent bien.

BOULINGRE J.-Baptiste, 72 ans, demeurant à Livry (S.-et-O.) Mordu le 19 juillet au poignet droit; 2 morsures pénétrantes qui ont saigné beaucoup. Chien reconnu enragé par un vétérinaire.

Plaies non cautérisées. Boulingre a été traité à l'Institut Pasteur du 20 juillet au 6 août. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 23 août. Mort le 26 août.

NAVARRE Louis, 6 ans, demeurant chez son père, 30, rue de Sambre-et-Meuse, à Paris. Mordu le 15 septembre, sous le menton côté droit, 1 morsure pénétrante; lèvre supérieure et lèvre inférieure, chacune 1 morsure pénétrante. Le chien, jeté dans le canal aussitôt, n'a pu être examiné par un vétérinaire.

Navarre a été traité à l'Institut Pasteur du 17 septembre au 7 octobre. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 26 octobre. Mort à l'hôpital Pasteur le 28.

ROCHELLE Louis, 46 ans, 4, rue Bayard à Paris. Mordu le 14 octobre à la main droite, face dorsale et face palmaire; 6 morsures profondes qui ont saigné. Lavées seulement à l'eau salée. Mordu par un chat reconnu enragé par un vétérinaire.

Rochelle a été traité à l'Institut Pasteur du 26 octobre au 12 novembre. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 26 décembre. Mort à l'hôpital Pasteur le 29 décembre.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

16me ANNÉE 25 JUILLET 1902 N° 7.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA DIGESTION CHEZ LES AMIBES
ET SUR LEUR DIASTASE INTRACELLULAIRE

Par HENRI MOUTON

I
INTRODUCTION

Les diastases extracellulaires sécrétées par les organismes inférieurs qui, comme les bactéries, se nourrissent par osmose sont aujourd'hui bien connues. Les propriétés diastasiques des liquides digestifs des animaux supérieurs, ont été aussi bien étudiées malgré que des travaux récents aient montré, dans le mécanisme de leur action, une complexité jusqu'ici insoupçonnée.

Au contraire, l'action des diastases intracellulaires, qui à l'intérieur des cellules dissolvent des éléments figurés englobés dans des *vacuoles digestives*, n'est le plus souvent connue que par des études microscopiques faites *in vivo*. Ces diastases jouent pourtant dans la nature un rôle important. La digestion intracellulaire a depuis longtemps été signalée chez les Protozoaires (amibes, infusoires ciliés, etc.), chez les Myxomycètes.

On sait aussi, surtout depuis la remarquable série de travaux de Metchnikoff [1], que la digestion est effectuée exclusivement à l'intérieur des cellules endodermiques chez la majorité des Cœlentérés et des Plathelminthes. Un travail récent de Mesnil [2] a levé tous les doutes à cet égard en ce qui concerne

1. METCHNIKOFF, *Zool. Anzeiger* (1878), t. I; (1880), t. III; (1882), t. V.
2. MESNIL, *Ann. Inst. Pasteur* (1901), t. XV.

les Actinies, et c'est là un résultat bien fait pour surprendre si l'on songe au volume considérable des proies vivantes que ces animaux sont capables de digérer.

Enfin, chez les animaux plus élevés en organisation, de nombreuses cellules de l'organisme, dites à cause de cela phagocytes, ont conservé la propriété de digérer intracellulairement, soit les corps étrangers qui s'introduisent dans l'organisme, soit même les éléments de l'animal qui ne présentent plus une résistance suffisante. On leur doit ainsi la défense active de l'organisme contre les microbes et la disparition des tissus vieillis dans ces transformations profondes qu'un grand nombre d'animaux subissent à certaines périodes de leur développement et auxquelles on réserve aujourd'hui le nom de métamorphoses.

C'est encore à Metchnikoff que l'on doit ces notions que, aidé de ses élèves, il a appuyées d'observations nombreuses.

Si le phénomène de digestion intracellulaire est très répandu dans le règne animal, nulle part il n'est aussi facilement observable que chez les Protistes, et des observations nombreuses ont été faites sur la nature des matières qu'ils sont capables de dissoudre et sur les conditions de cette digestion.

Des recherches de nombreux auteurs au nombre desquels il faut citer Meissner, Greenwood, Le Dantec[1], Rhumbler, etc., il résulte que ce sont surtout des matières protoplasmiques empruntées à des êtres vivants (algues ou bactéries) que les amibes dissolvent dans leurs vacuoles digestives.

Des résultats analogues ont pu être obtenus chez les infusoires ciliés où plusieurs observateurs ont vu cependant quelques variétés d'amidon (amidon de pomme de terre) légèrement attaquées dans les vacuoles digestives[2]. Les Métazoaires qui font de la digestion intracellulaire leur mode normal de digestion, dissolvent surtout des matières albuminoïdes.

Il existe donc dans les vacuoles digestives des cellules une diastase protéolytique dont l'existence a été mise en évidence, pour la première fois chez les Myxomycètes, par les travaux de De Bary et de Krukenberg. Or, on connaît diverses protéases différant entre elles par les conditions de leur activité et par les

1. Le Dantec, *Thèse de la Faculté des Sciences*. Paris (1891), et *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. IV et V.

2. Meissner, *Zeitsch. f. wiss. Zool.* (1888). — Fabre-Domergue, *Ann. Sc. nat Zool.*, t. V, 7e sér. (1888).

produits qu'elles donnent aux dépens de la matière transformée : la pepsine de l'estomac des mammifères, par exemple, digère en milieu nettement acide; elle donne aux dépens des matières albuminoïdes des peptones ; la trypsine, versée par le pancréas dans l'intestin des mêmes animaux, agit en milieu neutre ou faiblement alcalin et donne, en même temps que des peptones, des corps de composition plus simple parmi lesquels on rencontre toujours la leucine et la tyrosine. Ces deux diastases protéolytiques forment ainsi deux types différents dont se rapprochent un grand nombre d'autres diastases extraites d'animaux ou de plantes.

On a tenté depuis longtemps de connaître les conditions d'activité des protéases intracellulaires, en faisant absorber aux animaux des réactifs colorants dont la teinte soit apparente au microscope et soit capable de changer suivant la réaction acide ou alcaline du milieu. Il est seulement bien entendu que l'on doit choisir des substances non toxiques.

Chez une amibe et chez plusieurs espèces d'infusoires ciliés, Engelmann put ainsi constater que les grains de tournesol ingérés devenaient rouges, mais il attribua la réaction acide au protoplasme. Metchnikoff rectifia cette erreur en montrant que le protoplasme était en réalité alcalin et les vacuoles seules acides chez deux infusoires ciliés : *Vorticella* et *Stylonychia*. Il essaya en vain, ainsi que d'autres auteurs, d'obtenir le même virage du tournesol chez certaines autres espèces d'infusoires ciliés et chez les amœbiens. Le liquide dans lequel vivent tous ces animaux est d'ordinaire assez alcalin au tournesol. En le sensibilisant par une addition ménagée d'acide, ce que peu d'espèces supportent, Le Dantec a pu montrer, avec le même réactif, la sécrétion d'acide dans les vacuoles digestives du Stentor, de la Paramécie, etc... Il a démontré fort élégamment que les grains rouges que l'on trouve au bout d'un certain temps dans les vacuoles digestives des animaux sont bien des grains de tournesol, en écrasant les infusoires sous le microscope[1]. On voit alors brusquement les grains rouges reprendre leur teinte bleue primitive. Le même changement subit de couleur peut s'observer lorsqu'une vacuole se trouve rejetée par l'animal.

1 METCHNIKOFF (*Ann. Inst Pasteur*) avait déjà employé ce procédé chez les Myxomycètes.

D'autres réactifs que le tournesol peuvent être employés dans le même but et j'ai eu souvent l'occasion d'observer chez *Paramæcium aurelia* le bleuissement des vacuoles digestives lorsqu'on plonge les animaux en expérience quelques instants dans une solution étendue de rouge Congo. Au bout d'un temps assez court, tous les individus contiennent de nombreuses vacuoles dont la teinte varie du rouge (réaction neutre ou alcaline) au bleu (réaction acide).

Aujourd'hui, la sécrétion d'acide dans les vacuoles digestives de toutes les cellules qui digèrent intracellulairement peut être considérée comme tout à fait établie. Mais il a fallu pour la mettre en évidence recourir souvent à des réactifs plus sensibles que le tournesol, capables de virer pour une moindre acidité. Pour les infusoires ciliés et les amibes, par exemple, Le Dantec a employé avec succès l'alizarine sulfo-conjuguée qui, violette en milieu alcalin, jaune en milieu acide, passe d'une couleur à l'autre d'abord par une série continue de teintes allant du violet au rose, avant de subir le virage brusque qui l'amène au jaune. Dans le milieu généralement assez alcalin où vivent les animaux en expérience, l'alizarine est violette, et comme ce milieu contient souvent une petite quantité de sels de calcium, elle y forme de petits cristaux aciculaires violets qu'ingèrent et dissolvent les amibes ou les infusoires. Les vacuoles qui les contiennent deviennent peu à peu roses, — et même jaunes chez les ciliés, comme il est facile de s'en convaincre en répétant cette expérience sur *Paramæcium aurelia.*

Il faut noter ici que l'ingestion de grains de tournesol par les cellules endodermiques d'une planaire a été obtenue par Metchnikoff qui en présentait aux animaux mêlés à du sang : un petit nombre de grains prennent dans les cellules une teinte violet clair. Par le même procédé, on a obtenu à l'intérieur des filaments mésentériques des actinies une coloration lilas des grains absorbés. Dans tous les cas, les grains restaient franchement bleus dans le milieu extérieur.

Toutes ces observations indiquent donc toujours la sécrétion dans les vacuoles digestives d'un acide[1], souvent d'ailleurs en trop petite quantité pour amener la réaction à une acidité

1. Je me contente de rappeler ici les observations faites par Metchnikoff avec le *neutralroth* et dont il sera question plus loin.

franche au tournesol. Aussi le ferment qu'elles contiennent doit-il être plus voisin de la trypsine que de la pepsine qui digère en milieu très franchement acide. Une telle diastase a d'ailleurs été déjà extraite de plusieurs organismes.

Krukenberg[1], Frédéricq, les premiers, ont pu, à l'aide de la glycérine, obtenir de plusieurs éponges et actinies un ferment trypsique. C'est un semblable ferment que tout récemment Mesnil a extrait des filaments mésentériques des actinies broyés dans l'eau de mer. Quant aux protozoaires, on n'avait pu jusqu'ici en extraire aucune diastase.

Il faut en effet pour entreprendre ce travail disposer d'une masse considérable d'animaux. Il faut d'autre part se mettre à l'abri de l'intervention des bactéries, qui sont de très actifs producteurs de ferments. Or, les amibes, les infusoires ciliés vivent constamment dans des milieux chargés de ces bactéries dont ils font leur nourriture ordinaire. Même les espèces de ciliés qui vivent d'infusoires plus petits fréquentent forcément les mêmes milieux. J'ai vainement cherché jusqu'ici à me procurer une quantité suffisante de ciliés *sensiblement* purs de bactéries pour pouvoir tenter une extraction de leurs ferments.

J'ai donc été conduit à me proposer de cultiver purement les amibes comme on cultive purement un grand nombre d'espèces de bactéries ou de champignons. Le problème n'était pas nouveau. Il avait été abordé par divers auteurs dans des buts différents. Les uns cherchaient surtout à séparer les différentes espèces amœbiennes, à étudier leur cycle de développement et quelques points de leur physiologie. Ils n'avaient pas à se soucier de la présence des bactéries, pourvu que les diverses espèces d'amibes fussent, dans les cultures, isolées les unes des autres. D'autres auteurs avaient surtout pour but de montrer le rôle pathogène que joueraient certaines espèces dans la dysenterie, par exemple. Ceux-là devaient essayer d'obtenir des cultures strictement pures. Or, on peut affirmer aujourd'hui que, malgré la variété des milieux employés, de telles cultures n'ont été obtenues, ni avec les amibes banales, ni avec les amibes prétendues pathogènes. On doit admettre, jusqu'à nouvel ordre, la nécessité d'introduire dans les cultures d'amibes au moins une espèce

1. Krukenberg, Ueber die Enzymbildung in den Geweben und Gefässen, *Untersuchungen d. phys. Inst. d. Univ. Heidelberg*, t. II.

bactérienne vivante, car une telle nourriture semble absolument indispensable à ces êtres. Dans ces conditions, on peut obtenir sans de trop grandes difficultés un développement assez abondant des amibes.

Je dirai ici quelques mots des travaux antérieurs aux miens sur la culture des Amibes. J'exposerai ensuite les caractères de l'espèce que j'ai employée et j'indiquerai le procédé de culture que j'ai suivi. Enfin je parlerai de quelques observations microscopiques que j'ai été conduit à faire sur cette espèce avant d'aborder l'étude de la diastase que j'en ai extraite.

II

TRAVAUX ANTÉRIEURS SUR LA CULTURE DES AMIBES

On trouve des amibes à l'état naturel dans l'eau, surtout dans celle qui, contenant des débris organiques en décomposition, est riche en bactéries, dans la terre humide, et aussi sur diverses matières en fermentation ou en putréfaction. Je ne parlerai pas des espèces qui ont été rencontrées dans le tube digestif ou dans ses annexes chez l'homme ou chez les animaux sains ou malades.

On se procure aisément des amibes en abandonnant à elles-mêmes des macérations de foin ou de paille dans l'eau. De nombreux milieux liquides permettent de les cultiver. Il paraît seulement important d'éviter un trop luxuriant développement des microbes qui les accompagnent [1]. L'emploi de milieux peu nutritifs, l'addition ménagée d'alcali ou d'antiseptiques permettent d'atteindre ce but. Il est aussi facile de cultiver les amibes sur des milieux solides transparents, à base de gélatine ou de gélose, qui rendent facile la séparation des diverses espèces et l'étude de leur cycle de développement. Celli et Fiocca [2] les premiers ont usé dans ce but d'une gelée

1. Il y a certainement une lutte active entre les amibes et les proies qu'elles ingèrent. Metchnikoff a développé cette idée dans son livre *Sur l'Immunité* (Paris, 1901). Voir aussi *Centralbl. f. Bakt.* (1902), 2e partie, p. 431, les récentes observations de Chrzaszcz sur une myxamibe qui se nourrit de levures. Dans la culture, quand l'un des deux organismes devient florissant, l'autre est étouffé.

2. Celli et Fiocca, *Centralbl. Bakt.*, t. XV (1894), p. 470, et t. XVI (1894), p. 329. *La Riforma medica* (1894), n° 187.

de *Fucus* (*Chondrus*) *crispus*, gelée transparente et, à ce que j'ai expérimenté, plus molle que la gélose. Cette gelée est ou non additionnée d'une petite quantité de bouillon et fortement alcalinisée. Les mêmes auteurs firent d'ailleurs des efforts infructueux pour séparer leurs amibes des diverses espèces bactériennes qui les accompagnaient.

Dans un travail plus récent, Beyerinck[1] a pu cultiver sur milieu solide deux espèces d'amibes dans des conditions différentes, mais dignes pour toutes deux d'être rapportées.

La première a été obtenue en même temps que le ferment nitrique et diverses autres espèces bactériennes sur une gélose épuisée par des lavages répétés et additionnée de quelques sels. Elle se multiplie sur les colonies de bactéries et s'en nourrit. L'auteur l'appelle *A. nitrophila*.

Dans une autre recherche, exposée par l'auteur dans le même travail que la précédente, une amibe a été isolée en présence d'une seule espèce microbienne. Cette espèce, que Beyerinck a nommée *A. zymophila*, parce qu'il l'a rencontrée en association avec des levures, a été isolée de raisins attaqués par des guêpes et en voie de fermentation spontanée.

Dans une culture sur extrait de malt gélatiné apparurent, avec une levure apiculée et un ferment acétique, des amibes que l'auteur parvint, par des isolements, à obtenir en présence de la levure seule ou du ferment acétique seul. Ces cultures purent être propagées sur l'extrait de malt gélatiné ou même sur le bouillon gélatiné. Elles paraissent pouvoir être indéfiniment conservées par repiquage à la façon des cultures bactériennes.

Que l'organisme qui les accompagne soit la levure ou la bactérie, les amibes forment des amas sur les colonies dont elles se nourrissent. L'auteur du mémoire fait au sujet de ces cultures une remarque fort curieuse : tandis que ni la levure ni le ferment ne liquéfient la gelatine, la liquéfaction se produit très rapidement en présence des amibes et ce phénomène est plus sensible dans les cultures avec la levure que dans celles qui contiennent le ferment, ce que Beyerinck attribue à la secrétion par l'amibe d'une diastase protéolytique liquéfiant la

1. Beyerinck, *Centralbl. Bakt.* 1re partie, t. XIX (1896), p. 257, et t. XXI (1897), p. 101.

gélatine et plus active en milieu alcalin qu'en milieu acide, et, par ce caractère, semblable à la trypsine. Il est assez singulier que cette diastase ne peut être attribuée au liquide rejeté par la vacuole pulsatile, l'espèce considérée n'en possédant pas : elle sortirait donc de l'amibe soit par osmose, soit lorsque se vident au dehors les vacuoles contenant les résidus de la digestion.

On pouvait penser que, comme c'est le cas pour les bactéries, cette diastase pouvait préparer à l'amibe des aliments absorbables par osmose. Cependant, des substances diffusibles que l'auteur a essayé de lui offrir, aucune n'a pu lui permettre de se multiplier sans bactéries, et c'est toujours sur les points de la culture où se remarquent les colonies microbiennes que l'amibe forme des amas abondants. La protéase qu'elle excrète paraît donc être un simple produit de rejet, inutile à l'animal. Mais si elle provient des vacuoles digestives, comme il est permis de le supposer avec Beyerinck, elle a eu un rôle utile et du même coup nous donne une indication sur la nature des diastases digestives intracellulaires.

J'ai cité amplement ce travail parce qu'il est très précis et nous fournit, outre cette dernière remarque intéressante, un exemple de ce que j'appellerai désormais une *culture pure mixte* dans laquelle nous voyons associée à l'amibe une seule espèce microbienne dont elle fait sa nourriture et au choix de laquelle elle se montre dans une certaine mesure indifférente.

Je ne citerai pas un certain nombre de travaux peu importants, mais je ne puis ne pas dire quelques mots des travaux d'auteurs qui ont obtenu d'autres cultures pures mixtes, mais n'ont malgré tous leurs efforts pu réussir à faire *développer* les amibes en culture pure, bien qu'ils aient pu les *isoler* de toute espèce bactérienne.

L'isolement des amibes a été obtenu par Frosch[1] de la manière suivante : après un certain temps de culture en milieu liquide ou solide, les conditions finissent toujours par devenir peu favorables pour les amibes, et elles s'enkystent, devenant ainsi plus résistantes aux agents physiques (chaleur, dessiccation) ou chimiques que sous leur forme mobile.

Ayant donc cultivé en présence de bactéries une seule espèce amœbienne extraite de la terre de jardin et ayant obtenu par

1. Frosch, *Centralbl f. Bakt.* 1re partie, t XXI (1897), p. 926.

des séparations répétées qu'elle ne fût accompagnée que d'espèces bactériennes asporogènes, Frosch chercha un moyen de détruire les bactéries, mais non les kystes. Il eut recours pour cela à une solution très concentrée de soude caustique (à 20 °/₀) qu'il fit agir sur la culture pendant 3 jours à la température du laboratoire. Au bout de ce temps, on put s'assurer que les bactéries étaient mortes et que les kystes vivaient. Ils étaient en effet capables de donner une culture lorsqu'on les ensemençait sur une gélose contenant des colonies d'une épaisse et courte bactérie asporogène immobile et arrondie aux bouts, que l'auteur avait isolée. Au contraire, ni les milieux solides et liquides, ni les milieux modifiés par la bactérie, ni même les corps des mêmes bactéries tuées ne permettaient le développement des kystes.

Il paraît toutefois possible dans certaines conditions de nourrir les amibes de corps bactériens tués par la chaleur, puisque Tsujitani[1] a décrit dans une note assez courte comment il y était parvenu. Cet auteur cultive d'abord en présence de bactéries une seule espèce amœbienne. Aux bactéries qui l'accompagnent naturellement, il substitue peu à peu le vibrion cholérique. Il reste à faire disparaître ce microbe asporogène. Tsujitani imbibe d'une culture vieillie, contenant des kystes, des fils de soie stériles et les laisse se dessécher dans un exsiccateur à acide sulfurique dans des conditions de stérilité parfaites. Au bout d'un temps convenable, on ensemence des fragments des fils desséchés. Les vibrions sont morts, les kystes restent susceptibles de régénération : il suffit de les ensemencer sur un milieu contenant des bactéries vivantes pour obtenir une culture d'amibes. Au contraire, tout développement est impossible sur tous les milieux stériles essayés. Jusqu'ici, point de résultat nouveau et la dessiccation permet seulement d'obtenir le même effet que l'on avait précédemment obtenu par l'action des alcalis. Mais en tuant des bactéries à une température peu élevée et les offrant en nourriture aux amibes, Tsujitani a pu obtenir des cultures, à vrai dire médiocres. Toutefois une espèce bactérienne particulière, que l'auteur a isolée d'une infusion de foin et dont il décrit les caractères, réussit, tuée par un chauffage de trois quarts d'heure à 60°, à permettre le développement d'aussi bonnes cultures d'amibes que les bactéries vivantes.

1. Tsujitani, *Centralbl. f. Bakt.* 1re partie, t. XXIV (1898), p. 666.

Récemment, les expériences de Frosch ont été reprises par Zaubitzer[1] sur une amibe isolée d'une infusion de paille. Il a employé la même méthode de séparation par les alcalis concentrés et n'a pu que confirmer les conclusions des autres auteurs relativement à la nécessité de donner aux amibes une proie vivante, puisque tous les autres aliments qu'il a pu leur offrir, même les microbes tués par la chaleur, ont été impuissants à assurer le développement de la culture.

J'ai cru devoir donner cet historique un peu complet de la question de la culture des amibes qui allégera d'autant l'exposition de mes propres recherches sur ce sujet[2]. J'arrive maintenant à la description de l'espèce d'amibe qui a servi dans ce travail et à l'exposé des méthodes de culture que j'ai employées.

III

DESCRIPTION DE L'AMIBE

De nombreuses espèces d'amibes ont été nommées depuis cinquante ans par divers auteurs. Un certain nombre manquent de description précise et d'autres font certainement double emploi, tandis que beaucoup sont trop compréhensives. Suivant les conditions dans lesquelles on la place, suivant même la nourriture qu'elle englobe, l'aspect d'une amibe peut varier beaucoup. Il faudrait certainement, pour un grand nombre d'espèces, faire ce que Celli et Fiocca ont fait pour certaines d'entre elles, ce que Beyerinck a fait pour *A. nitrophila* et *A. zymophila*: étudier le cycle complet du développement pour avoir des diagnoses précises. Je donne ici les caractères de l'amibe que j'ai employée.

Forme mobile. — Elle comprend un ectoplasme parfaitement hyalin, un endoplasme granuleux rempli de vacuoles digestives dont le nombre est parfois très considérable. A l'intérieur, est un noyau formé d'un gros karyosome réfringent entouré d'une auréole claire, le tout bien visible sur le vivant

1. Zaubitzer, *Arch. f. Hygiene*, t. XXIV (1901), p. 103.
2. Pour des détails plus complets, consulter R. Behla, *Die Amöben* (Hirschwald éd.), Berlin (1898).

(fig. 6). Les dimensions de l'amibe sont assez variables. On peut donner comme diamètre moyen 20 μ. Cette mesure est prise au moment où l'animal est sensiblement sphérique, comme il arrive lorsqu'on vient de l'agiter un peu en délayant une petite quantité de culture dans une goutte d'eau pour faire une préparation microscopique. Si l'on abandonne ensuite cette préparation à elle-même pendant quelque temps, et que l'amibe, s'accoutumant à ce nouveau milieu, étale ses pseudopodes à la surface du porte objet, son diamètre devient plus considérable. Je reviendrai sur ces variations de diamètre dues à l'aplatissement à propos de l'aspect des cultures. Lorsque l'amibe, dans une préparation, chemine en étalant ses pseudopodes, on voit à l'avant dans le sens de la marche une zone très étendue d'ectoplasme hyalin. Cet ectoplasme est au contraire peu étendu à l'arrière.

Cette amibe n'a pas de mouvements brusques, mais semble couler d'une manière continue, à la surface du support. Les pseudopodes qui ne sont pas très aigus se forment et se rétractent avec une lenteur uniforme. La vacuole pulsatile, qui bat environ toutes les minutes à la température du laboratoire, se trouve à l'arrière. Elle m'a toujours paru unique et jamais je ne l'ai vue accompagnée de vacuoles secondaires.

Kystes. — Les kystes, à peu près sphériques, ont un diamètre assez constamment compris entre 15 et 20 μ. Leur enveloppe épaisse montre un double contour : l'extérieur est généralement polygonal, l'intérieur arrondi. Le protoplasme contenu dans ces kystes est uniformément granuleux, sans aucune vacuole quand il est au repos. Mais la vacuole digestive apparaît souvent au moment où le kyste va s'ouvrir et ne disparaît que lorsqu'il est déjà formé. Lorsqu'elle existe, elle bat toujours.

On peut facilement obtenir l'enkystement des amibes dans une préparation microscopique qu'on laisse se dessécher très lentement. On observe dans ces conditions le rejet des vacuoles digestives après que l'amibe s'est arrondie et la transformation de la partie externe du protoplasma en l'enveloppe dure du kyste.

Les caractères de cette espèce la rapprochent assez de l'espèce que Frosch a employée et qu'il avait également isolée de la terre de jardin. Les kystes sont seulement ici d'un peu

plus grande dimension. Cette espèce d'amibes a été obtenue dans les conditions suivantes.

IV

RECHERCHE ET ISOLEMENT DE L'AMIBE

Une gélose très pauvre en matière nutritive, lavée à plusieurs reprises à l'eau distillée, est finalement transformée en gelée et stérilisée par chauffage à 120°. Cette gelée contient environ 2 0/0 de gélose sèche. On l'étale dans des boîtes de Pétri où on l'ensemence largement. Pour cela, on y répand une couche d'eau stérilisée dans laquelle on a d'abord délayé un peu de bonne terre (prise dans le jardin de l'Institut Pasteur) puis qu'on a laissé déposer les plus grosses particules de terre. L'ensemencement est donc fait avec le liquide légèrement trouble qui surnage; on enlève ensuite l'excès de cette eau. A la surface de la gélose ne tardent pas à apparaître de très maigres colonies bactériennes au milieu desquelles se déplacent des amibes qui bientôt deviennent très nombreuses. On reprend alors avec une aiguille de platine un peu de ces amibes et de ces bactéries et on les ensemence en un certain nombre de stries sur d'autres boîtes de Pétri contenant la même gélose. La culture bactérienne se développe cette fois sur les stries, et là aussi commence la multiplication des amibes. Mais celles-ci ne tardent pas à s'écarter de la ligne de culture, en cheminant en tous sens à la surface de la gélose. Au bout de quelques jours, un assez grand nombre d'entre elles peuvent s'être éloignées de 1 ou 2 cm., tandis que d'autres derrière elles continuent ce même mouvement. Il arrive alors que les unes continuant à errer à la surface du milieu de culture, les autres s'enkystent en donnant de place en place des amas fort caractéristiques (voir planche, fig. 1). C'est qu'en effet, au moment de s'enkyster, les amibes viennent s'appliquer les unes sur les autres, et il n'est pas rare de voir, en faisant une culture sur couche mince de gélose, de la manière que j'indiquerai plus loin, une amibe encore à l'état végétatif venir s'accoler à un amas de kystes déjà formé, et là s'arrondir et s'enkys-

ter à son tour. Quelle est la cause de cette agglomération? Peut-être les phénomènes de tension superficielle qui, comme plusieurs auteurs l'ont déjà montré, jouent un si grand rôle dans la biologie de ces êtres, doivent-ils être ici invoqués. Il est probable que l'amibe aplatie à la surface du milieu de culture peut s'arrondir plus facilement au contact de la saillie que font les kystes déjà formés à la surface de la gélose. Quoi qu'il en soit, les kystes sont si bien appliqués les uns sur les autres qu'ils deviennent polygonaux sur les faces par lesquelles ils se touchent (fig. 2).

On peut reprendre un amas de ces kystes et l'ensemencer à nouveau sur une gélose fraîche. Un certain nombre de bactéries toujours collées sur la paroi des kystes se multiplient alors et fournissent la nourriture nécessaire au développement des amibes. Les kystes éclosent, les amibes se multiplient, puis un certain nombre d'entre elles émigrent à leur tour hors de la colonie bactérienne, s'arrêtent à la surface de la gélose sur d'autres amas bactériens ou vont former en divers points du milieu de culture des amas de kystes au moyen desquels une culture pourra de nouveau être ensemencée.

En opérant ainsi, dans des milieux très pauvres, on a toujours un faible développement de bactéries, et si la gélose est assez humide, une abondante multiplication d'amibes. Ces cultures d'amibes n'atteignent toutefois jamais la richesse des cultures bactériennes, et au lieu de former à la surface de la gélose d'épais amas visibles à l'œil nu, elles ne donnent qu'un léger dépoli, une apparence mate à la surface, partout ailleurs brillante, du milieu de culture.

V

CULTURES PURES MIXTES DE L'AMIBE

Les auteurs qui se sont occupés de la culture des amibes ne sont pas arrivés (à une exception près) à en obtenir en l'absence de bactéries *vivantes*. Aussi, renonçant provisoirement à obtenir des cultures pures, ne me suis-je proposé que d'obtenir ce que j'ai déjà appelé plus haut des cultures pures mixtes, c'est-à-dire des cultures

en présence d'une seule espèce microbienne. Cela me suffisait, comme je le montrerai, pour atteindre le but principal de ce travail qui est d'obtenir et d'étudier la diastase protéolytique des amibes. J'ai donc cherché à nourrir exclusivement d'une espèce bactérienne déterminée l'espèce que j'avais isolée. Je me suis servi le plus souvent dans ce but du *Bacterium coli commune*. Voici comment ont été conduites les recherches sur ce sujet.

De la gélose peu nutritive et assez molle est coulée en boîtes de Pétri. Au centre d'une boîte, on dépose, avec une anse de platine, une petite quantité d'une culture impure (contenant, outre les amibes, diverses espèces bactériennes). Les amibes ne tardent pas à se multiplier sur place, puis à émigrer en tous sens hors de la tache où elles avaient été placées d'abord. Elles vont ainsi, transportant avec elles quelques bactéries, former plus loin des amas de kystes ou même d'autres colonies lorsque les quelques bactéries qu'elles ont abandonnées en un point ont eu le temps d'y former une colonie microbienne.

Mais, sur la gélose, disposons de place en place des amas d'un microbe dont nous voulons nourrir notre amibe. Celle-ci, arrivant sur cet amas, au hasard de son cheminement à la surface de la culture, s'y multipliera plus ou moins abondamment, et, au bout de quelque temps, des individus formés dans cette colonie émigreront à leur tour dans toutes les directions. Ils contiendront dans leurs vacuoles digestives ou entraîneront collés à leur surface un nombre de microbes de l'espèce choisie beaucoup plus considérable que de toutes les autres espèces qui les accompagnaient préalablement, ce dont il est facile de s'assurer par des préparations microscopiques.

Cet entraînement de microbes par les amibes et l'extension des cultures bactériennes qui en résulte peuvent être vérifiés facilement à l'aide des cultures en boîte de Pétri dont la contamination par les microbes de l'air est facile. Quand la gélose se trouve ainsi spontanément ensemencée d'une colonie bactérienne dans une boîte qui ne contient pas d'amibes, cette colonie se développe, bien entendu, absolument isolée et conservant une forme généralement circulaire.

Supposons au contraire qu'on ait ensemencé au centre de la boîte une tache d'amibes, et qu'à mi-chemin du bord se soit formée une colonie d'une bactérie facile à reconnaître à l'œil

nu, par exemple de *Micrococcus prodigiosus* ou de certaines sarcines jaunes. Lorsque les amibes atteignent cette colonie, elle ne tarde pas à être entourée *uniformément en tous sens* d'un grand nombre de petites colonies-filles dont le nombre et l'aire de dispersion vont sans cesse en augmentant. C'est ce que j'ai eu souvent l'occasion d'observer (voir planche, fig. 10). Cela prouve aussi que les amibes reviennent vers la tache centrale aussi bien qu'elles s'en éloignent et que leur marche, à la surface de la culture, est absolument désordonnée. C'est ce qu'on peut conclure aussi de l'aspect des *pistes* dont je parlerai plus loin.

Bien entendu, le microbe nouveau introduit dans la culture ne fait que s'ajouter ainsi à ceux qu'elle contenait déjà, mais il est en quantité prépondérante chez les amibes qui, dans la culture, ont dépassé son amas. Disposons maintenant les choses autrement. Autour de la tache centrale ensemencée d'amibes, traçons des stries rayonnantes formées du microbe que nous voulons substituer aux autres. Les amibes s'avancent dans la culture beaucoup plus rapidement le long de chaque strie que dans les intervalles. Au fur et à mesure qu'elles cheminent, la culture se purifie et les microbes étrangers diminuent en nombre. On peut se rendre compte de son degré de pureté par des préparations microscopiques et mieux encore par des cultures répétées sur des milieux favorables aux bactéries. Quand les amibes ont atteint à la périphérie la limite des stries, on les reprend en ce point pour en ensemencer la tache centrale d'une nouvelle boîte et ainsi de suite. L'expérience montre qu'au bout de plusieurs opérations, on peut le plus souvent obtenir ce que j'ai appelé une culture pure mixte. Ce n'est qu'une affaire de temps.

Ce procédé est, en somme, assez voisin de celui que Tsujitani a employé pour isoler l'amibe dont il a fait la culture en présence d'un vibrion cholérique et que j'ai rappelé plus haut. J'ai pu ainsi isoler l'amibe dont j'ai donné la description, en présence du *Bact. coli commune*, du *Vibrio Metchnikovi*, d'un *Vibrion cholérique* (var. dite de la Prusse orientale), du *Staphylocoque doré*, du *bacille du charbon* (var. asporogène), du *bacille de la morve* et même d'une petite espèce de levure (*Saccharomyces exiguus*) de taille assez faible pour que l'amibe puisse l'ingérer

facilement. On voit donc que l'amibe n'a pas manifesté d'exigences très spéciales au point de vue du choix de l'espèce dont elle se nourrit. Elle a aussi bien accepté le *B. coli* que la levure et a donné avec l'un et l'autre d'abondantes cultures. D'autres microbes toutefois ont paru moins favorables, et avec le *B. anthracis*, les cultures ont toujours été fort médiocres. Il m'a paru toutefois à plusieurs reprises que des microbes de cette espèce (var. asporogène), prélevés sur une vieille culture qui refusait de se multiplier à nouveau, et qui devaient donc être sinon morts, du moins très affaiblis, étaient acceptes plus facilement que ceux qui continuaient à se développer dans la culture concurremment avec les amibes. Je n'ai pu poursuivre assez les expériences sur ce point pour arriver à une certitude absolue. Ce résultat ne serait pas forcément en contradiction avec le fait que les amibes refusent de se nourrir de microbes morts. Ceux qu'on leur offre sont généralement tués par la chaleur qui doit coaguler et ainsi modifier assez profondément leur protoplasme.

Lorsque les cultures ont été expérimentalement reconnues pures, on en prélève une petite quantité que l'on sème sur gelose inclinée dans des tubes à essai où l'on a eu soin d'ensemencer d'avance le microbe qui doit servir de nourriture afin que la culture puisse se développer rapidement. Après avoir pris, au bout de quelques jours, leur plus grande extension, ces cultures s'enkystent. Dans cet état, elles peuvent être conservées très longtemps, et, pourvu que la gélose ne soit pas devenue complètement sèche, elles peuvent encore être très facilement régénérées après plus de six mois.

J'ai dit que les meilleures cultures d'amibes étaient toujours peu abondantes. Aussi a-t-il fallu, pour la recherche de la diastase intracellulaire, faire des cultures sur de très grandes surfaces. Je me suis servi pour cela de grandes boites plates qui servent d'ordinaire pour la culture en grand des bacilles de la tuberculose ou de la peste. Chaque boîte offre une surface utile de plus de 2 décimètres carrés. On peut en stériliser un grand nombre à la fois dans un autoclave de Vaillard et Besson. Il est dans ces conditions possible, sinon facile, d'obtenir, en employant un matériel suffisant, une masse appréciable d'amibes, beaucoup moindre toutefois que la masse de microbes que

l'on pourrait obtenir sur une même surface de culture.

Ces boîtes offrent encore l'avantage de pouvoir être placées, comme les boîtes de Pétri, sous le microscope, et l'on peut y suivre la marche de la culture, chose indispensable si l'on veut récolter les amibes au moment où elles sont nombreuses et ne se sont pas encore enkystées.

On introduit dans les boîtes de la gélose obtenue par le mélange suivant : 100 c. c. de bouillon de veau ordinaire des laboratoires, 900 c. c. d'eau, 10 grammes de gélose; le tout doit être légèrement alcalinisé. On stérilise et l'on ensemence avec une pipette le contenu délayé dans un peu d'eau stérile d'un des tubes de culture précédemment obtenus. On peut couvrir la gélose de liquide, puis aspirer de nouveau le liquide en excès pour ensemencer d'autres boîtes, ou encore, ne lançant dans la boîte qu'une petite quantité de liquide, agiter pour la mêler à l'eau de condensation et faire couler le tout à la surface de la gélose qu'on couvre ainsi d'un réseau de traces liquides. La culture va commencer sur ces traces. Les bactéries se développent d'abord, marquant bientôt les régions ensemencées, puis les amibes se multiplient et l'on voit au microscope des amas de petites taches rondes réfringentes au milieu des bactéries. Elles commencent alors à envahir tout l'espace occupé par ces bactéries. Elles le remplissent tout entier vers le quatrième jour de la culture, et, dès ce moment, émigrent peu à peu dans l'espace encore libre qui se trouve entre les mailles du réseau. C'est alors qu'on peut apercevoir parfois (mais non toujours) de curieuses *pistes* réfringentes très sinueuses qui se croisent en tous sens et à l'extrémité de chacune desquelles on aperçoit une amibe. Peut-être faut-il en rapporter l'origine à l'excrétion de la vacuole pulsatile. Peut-être aussi convient-il de les rapprocher de ces filaments visqueux extraordinairement longs et fins que laissent après eux, d'après Leidy, en se retirant, les pseudopodes d'un amœbien testacé (*Difflugia lobostoma*).

Quoi qu'il en soit, dès que les amibes quittent la partie de la culture occupée par les bactéries pour la partie qui en est encore libre, elles changent d'aspect.

Elles étaient sphériques et de petit diamètre. Sans changer de volume, elles s'aplatissent et deviennent par conséquent plus larges et leur contour prend des formes variées. Comme

elles entraînent toujours avec elles un certain nombre de bactéries, la culture de celles-ci s'étend à son tour, et vers le 6e ou 7e jour, toute la surface est également peuplée d'amibes mobiles et de bactéries, et rien ne distingue plus les régions d'ensemencement. C'est le moment où l'on doit récolter la culture, pour obtenir le plus d'amibes à l'état végétatif et par suite la plus grande quantité de diastase.

Passé ce temps, le nombre d'amibes mobiles diminue très brusquement, et la culture se remplit d'amas parfois énormes de kystes dont j'ai décrit plus haut l'aspect très caractéristique. Les cultures peuvent alors être conservées comme semence. Lorsque les kystes ont vieilli dans une culture, un certain nombre d'entre eux sont vides et ne montrent plus que l'enveloppe extérieure ouverte; les autres ont un contenu uniformément granuleux. Je n'ai pu mettre en évidence à l'intérieur des kystes une sporulation donnant naissance à un très grand nombre de germes possédant chacun un noyau dérivé du noyau unique de l'amibe enkystée, comme cela a été figuré par Scheel[1] chez *A. proteus* où cet auteur estime à 400 le nombre des germes dans un seul kyste, comme cela a été vu aussi par Schaudinn[2] chez *Paramœba eilhardi*, une amibe assez aberrante, puisqu'elle a dans son cycle d'évolution des formes flagellées rappelant la forme *Cryptomonas*. Mais j'ai souvent aperçu dans les préparations des germes assez petits, généralement groupés par 2 ou 4, et qui ne sont nettement vacuolaires que lorsqu'ils ont une taille suffisante. On ne les observe pas lorsqu'on repique sur un milieu neuf des kystes qui viennent de se former dans une culture, mais seulement en réensemençant des kystes vieillis. Il y a lieu de penser que ces germes se forment dans les kystes par division du noyau et du protoplasme lorsque les kystes sont longtemps abandonnés dans un milieu défavorable. Au contraire, lorsqu'on réensemence les kystes aussitôt après leur formation, la division n'a pas eu le temps de s'accomplir à leur intérieur, et du kyste ne sort qu'une seule amibe.

J'ai observé autrefois un fait analogue chez les euglènes. Je l'ai d'ailleurs retrouvé depuis, exposé dans un travail de

1. Scheel, Beiträge zur Fortpflanzung der Amöben, *Festschr., f.* v. Kuppfer, Iéna, 1899.
2. Schaudinn, *Sitzungsber. d. kgl. preuss. Akad. d. Wiss.* Berlin, 1896.

Garcin. Dans certaines conditions, ces êtres s'enkystent, et, suivant les circonstances, le noyau du kyste se multiplie ou non. Dans le premier cas, la masse intérieure prend l'aspect d'une *morula;* dans l'autre, elle est entièrement sphérique; et suivant le cas, il sort du kyste soit une seule euglène, soit un certain nombre de ces flagellés, mais de taille nécessairement plus petite.

Les cultures peuvent généralement être conservées au laboratoire, et leur développement y est le plus souvent assez rapide. Toutefois, pendant les grands froids de l'hiver où la température s'abaisse beaucoup la nuit, je me suis trouvé bien de les mettre à l'étuve à 22°. L'étuve à 37°, qui convient à la culture de la plupart des espèces bactériennes, ne saurait être employée pour les cultures d'amibes qui cessent de se multiplier et s'enkystent.

Avant d'aborder la question de l'extraction et de l'étude *in vitro* de la diastase des amibes, je crois bon d'exposer ici quelques observations microscopiques que j'ai pu faire sur les échanges des amibes avec le milieu extérieur. J'exposerai d'abord des faits relatifs à la digestion. Je dirai ensuite quelques mots des propriétés osmotiques du protoplasme de ces êtres.

VI

OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES SUR LA DIGESTION CHEZ LES AMIBES

On peut facilement observer l'amibe soit dans l'eau entre lame et lamelle, soit en goutte pendante, soit encore dans des conditions qui se rapprochent davantage de celles de mes cultures, en étalant à la surface inférieure d'une lamelle une goutte de gélose encore liquide, y ensemençant quelques kystes d'amibes et déposant la lamelle sur un porte-objet creux. On peut ainsi suivre l'éclosion des kystes et le cheminement des amibes sur la gélose, même avec l'objectif à immersion si la couche de gélose est suffisamment mince. J'ai indiqué plus haut l'aspect de l'amibe et son mode de progression. Je dois maintenant attirer l'attention sur un phénomène curieux, et qui peut

être dans la nutrition de l'amibe d'une grande importance.

Agglutination des microbes par le liquide de la vacuole pulsatile. — Ce phénomène s'observe très bien chez les amibes nourries de *B. coli*. Lorsque ces amibes sont placées entre lame et lamelle et qu'elles étalent leurs pseudopodes, on voit souvent au voisinage de la vacuole pulsatile, qui, comme on le sait, occupe toujours une position périphérique, des amas nombreux de microbes dont un certain nombre s'agitent sur place sans s'éloigner de ce point. J'avais d'abord attribué ce fait à une chimiotaxie positive exercée par la sécrétion de la vacuole pulsatile. M. Borrel, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, m'a suggéré que l'apparence observée ressemblait exactement à une agglutination. Il est très vraisemblable que ce phénomène aide beaucoup à la capture des microbes par l'amibe, puisqu'il lui permet de les rassembler et de les retenir tout contre elle. On sait d'ailleurs que chez les animaux supérieurs dont les leucocytes s'adaptent à digérer rapidement une espèce microbienne déterminée, l'agglutination est quelquefois le prélude de la digestion et qu'elle la rend plus facile.

Cette propriété a surtout été observée chez des amibes nourries depuis longtemps exclusivement de *B. coli*. S'agit-il là, comme pour les leucocytes des vertébrés, d'une propriété acquise et est-elle limitée à l'espèce microbienne à laquelle l'amibe s'est adaptée? Nous penchons pour l'affirmative. En effet, nous n'avons jamais observé de phénomène semblable chez les amibes nourries de staphylocoque. Des amibes ordinairement nourries de levure ne nous ont pas paru non plus agglutiner le *B. Coli* qu'on y mêlait dans une préparation.

Je n'ai pas à insister ici sur l'englobement des microbes qui a été très bien décrit par un grand nombre d'auteurs et que j'ai exposé au début de ce travail. Je n'ai rien à ajouter à cette description. J'ai aussi rappelé les travaux qui ont été faits sur la variation de la réaction de la vacuole digestive chez l'amibe. J'ai suivi par deux procédés différents le sort des microbes ingérés dans la vacuole digestive : 1° par coloration sur le vivant, et 2° sur des préparations fixées.

Coloration des microbes dans l'amibe vivante par le neutralroth. — J'ai employé pour colorer les microbes dans l'amibe

vivante une substance qui a été introduite dans la technique par Ehrlich : le rouge neutre (*neutralroth*). Metchnikoff s'est aussi servi de ce colorant pour teindre les inclusions des vacuoles digestives chez les turbellariés et les actinies. On peut teindre par le même procédé les microbes englobés par les leucocytes des animaux supérieurs. Enfin, chez les infusoires ciliés, on obtient aussi avec ce réactif de très bonnes colorations du contenu des vacuoles digestives. Une propriété intéressante du neutralroth est de virer au jaune dans les milieux très alcalins et ensuite, lentement, du rouge cerise au rouge pourpre lorsque les liquides deviennent acides. Par leur coloration, les matières qui prennent la couleur dans les vacuoles attestent, dans tous les cas ci-dessus, une acidité plus grande que celle du milieu extérieur. Sur les indications de M. Metchnikoff, j'ai employé le même réactif pour colorer les bactéries ingérées par les amibes (voir planche, fig. 5). Elles se teintent d'une couleur d'un rouge plus foncé que les éléments qui ne sont pas englobés et manifestent ainsi que la réaction des vacuoles digestives est plus acide que celle du liquide extérieur. Ce sont seulement les éléments déjà morts qui se laissent colorer, et l'amibe elle-même finit par prendre la couleur si une trop grande concentration de la liqueur vient à la tuer. Si l'on colore au rouge neutre une amibe ayant absorbé uniquement des levures, un certain nombre restent incolores, d'autres prennent le rouge : ce sont celles qui sont déjà en voie de digestion.

Coloration des microbes en voie de digestion dans les préparations fixées. — Les colorations faites sur des préparations fixées permettent de suivre avec plus de précision la transformation que subissent les microbes en voie de digestion dans les vacuoles digestives.

La méthode de coloration qui m'a donné les résultats les plus intéressants à ce point de vue est celle qui a été imaginée par Laveran pour la coloration des hématozoaires endoglobulaires et qu'il a employée aussi avec succès, en collaboration avec Mesnil, pour l'étude des trypanosomes.

On fait sur un porte-objet un frottis d'un peu de culture délayée dans une goutte d'eau. On étale et l'on fait sécher rapidement. On fixe ensuite par l'alcool absolu pendant dix minutes et l'on colore par un mélange en proportions déterminées de

bleu de méthylène à l'oxyde d'argent (bleu Borrel) et d'éosine, mélange qui doit être préparé au moment même de l'emploi, car il précipite rapidement. On différencie ensuite par le tannin à 5 0/0. L'endoplasme se colore en bleu violacé, l'ectoplasme souvent en bleu, les microbes en violet. Quant au noyau, il prend *en entier* une coloration pourpre. On n'y voit pas le karyosome : c'est la vacuole qui l'entoure qui prend la couleur, et sur des préparations mal colorées, on se rend compte qu'en réalité il prend une teinte bleu clair moins intense que celle du protoplasme. Dans quelques individus, le noyau est allongé et étranglé en son milieu; c'est le début d'une division directe. On sait que la division directe est de règle chez les amibes, bien que quelques espèces présentent une division karyokinétique comme cela a été indiqué pour *A. binucleata* par Schaudinn.

Les préparations faites avec des amibes nourries de diverses espèces microbiennes montrent les microbes dans les vacuoles digestives. On peut par le procédé indiqué bien mettre en évidence l'englobement du *B. coli* ou du vibrion cholérique. Les microbes remplissent les nombreuses vacuoles digestives qui réduisent à un réseau de mailles l'endoplasme interposé. Je n'ai toutefois pas réussi à observer une transformation des vibrions cholériques en boules comme cela se présente lorsqu'ils sont englobés par des leucocytes. M. Metchnikoff dit également avoir fait absorber à des paramécies du vibrion cholérique sans observer le même phénomène. Les préparations que l'on obtient avec des amibes nourries de levure sont fort belles. Elles montrent dans chaque vacuole digestive une et une seule cellule de levure qui la remplit presque complètement, la cavité de la vacuole n'étant représentée que par une mince auréole claire qui l'entoure.

Au point de vue de la digestion des microbes dans les vacuoles digestives, les plus intéressantes préparations ont été obtenues avec des amibes nourries de staphylocoque. Les microbes. à l'extérieur des cellules. prennent une belle coloration violette et il en est de même d'un certain nombre de ceux qui sont englobés. Dans plusieurs vacuoles, on trouve les microbes gonflés et prenant une couleur lilas pâle. Dans d'autres encore, ils sont réduits à l'état de granulations à peine teintées. Les pas-

sages entre les divers stades de ce processus de digestion peuvent être très facilement suivis sur les préparations (fig. 9).

VII

PROPRIÉTÉS OSMOTIQUES DE L'AMIBE

A. Pénétration et fixation des matières colorantes. — L'osmose semble, ainsi que nous l'avons dit, ne jouer aucun rôle dans la nutrition des amibes. Ce n'est pas cependant que leur protoplasme soit incapable d'être pénétré d'aucune substance. Nous pouvons mettre surtout en évidence cette pénétration à l'aide de matières colorantes capables de teindre dans la cellule certains éléments et qui, se portant exclusivement sur ces points, peuvent déceler même une très faible perméabilité de la matière vivante.

C'est à Brandt (1879) que l'on doit la première indication de cette introduction facile de certaines substances colorantes peu toxiques à l'intérieur de la cellule vivante. Plus tard, le botaniste Pfeffer (1886) a employé entre autres couleurs le bleu de méthylène dont Hertwig s'est aussi servi pour teindre sur le vivant le noyau d'œufs de métazoaires. Un grand nombre de couleurs telles que la vésuvine, le bleu de quinoléine peuvent ainsi pénétrer les cellules vivantes. Cette dernière couleur a ainsi été employée par Cetres pour teindre des granulations grasses chez des infusoires.

Nous-même avons utilisé plus haut cette facile pénétration dans les cellules du rouge neutre pour suivre dans les vacuoles digestives le sort des microbes englobés.

Une solution faible de bleu de méthylène donne assez rapidement au karyosome du noyau une teinte bleu clair tandis que la vacuole nucléaire qui l'entoure reste absolument incolore et que les microbes qui se trouvent dans les vacuoles digestives prennent une teinte bleue plus foncée. C'est cette apparence qui a été représentée sur la figuré 7 de la planche qui accompagne ce travail.

Il est curieux de noter que ce karyosome, qui fixe bien la

couleur lorsque l'animal est vivant, la fixe bien moins que le protoplasme lorsque l'amibe a été tuée et fixée soit par la chaleur, soit par l'alcool absolu ou l'alcool-éther. Le bleu de méthylène employé après ces fixations ne permet de discerner qu'assez mal le noyau marqué seulement au milieu de l'endoplasme par une tache un peu pâle, sans contours nets, et par l'absence de vacuoles digestives. On sait d'ailleurs que le noyau des protozoaires en général présente des propriétés spéciales au point de vue des colorations et que les couleurs qui différencient le noyau chez les métazoaires réussissent souvent mal au contraire chez eux.

Le même phénomène peut être observé chez les kystes au moins jeunes dans lesquels le karyosome du noyau se colore bien par pénétration très lente du bleu de méthylène, et ne se colore pas au contraire si l'on a employé quelque moyen de fixation.

Le bleu de méthylène n'est pas la seule couleur qui puisse pénétrer dans l'amibe vivante et la colorer. J'ai employé aussi le violet dahlia qui teint très vivement le karyosome. Mais cette couleur est certainement toxique, car lorsque le noyau se colore, on ne tarde pas à voir l'amibe, qui reste d'ailleurs bien étalée avec ses pseudopodes nets, ses vacuoles digestives remplies de microbes, prendre tout entière une coloration violet pâle et rester immobile.

J'ai obtenu des résultats semblables avec le rouge de ruthénium que j'ai pu employer grâce à l'obligeance de M. Nicolle. Ce réactif, dont l'emploi est malheureusement restreint en histologie à cause de son prix élevé, teint vivement le karyosome en rouge, mais le protoplasme prend en même temps une coloration rose pâle, comme il a été représenté sur la figure 8. Il faut noter que ce réactif continue à colorer l'amibe après la fixation par l'acide osmique qui gêne d'ordinaire beaucoup les colorations, et que, dans ces conditions, l'électivité du karyosome pour la couleur est maintenue.

Au point de vue de la pénétration des matières colorantes et de leur fixation sur le noyau, je pourrais répéter pour les kystes tout ce qui vient d'être dit pour les amibes, à ceci près que, la membrane prenant très vivement les couleurs, il est souvent difficile de voir les différences de coloration prises par les parties internes.

B. Plasmolyse des kystes. — Si les amibes se laissent facilement pénétrer par de petites quantités de matières colorantes, qui s'y introduisent lentement, en revanche leur substance est peu perméable à un grand nombre de substances solubles dans l'eau telles que les sels. C'est ce qu'il est possible de montrer, sinon chez les amibes à l'état végétatif, au moins chez leurs kystes, par l'étude du phénomène de la plasmolyse.

Les kystes jeunes d'amibes que l'on trouve en très grande abondance dans une culture d'environ 8 à 10 jours permettent d'observer facilement ce phénomène de plasmolyse. Si, par exemple, nous plongeons dans une goutte d'eau salée à 2 à 3 0/0, sous le microscope, une petite quantité de kystes extraits d'une culture, nous voyons le protoplasme se rétracter, abandonnant en un certain nombre de points ou même parfois sur toute la surface de contact la paroi du kyste qui joue ici le même rôle que la paroi de cellulose dans les cellules végétales, et ne sert que de repère pour mettre en évidence la diminution de volume de son contenu. Elle-même ne subit aucune rétraction : ce n'est pas qu'elle soit très rigide, car lorsqu'on soumet les kystes à la dessiccation, on la voit se plisser très facilement; cela prouve seulement qu'elle est parfaitement perméable à toutes les substances qu'on peut mettre en solution dans l'eau. On peut le montrer pour les matières colorantes en plongeant des kystes dans l'eau salée à 2 0/0 colorée par le bleu de méthylène, puis remplaçant rapidement par de l'eau salée de même concentration non colorée. Les espaces abandonnés par le protoplasme restent colorés.

En disposant entre lame et lamelle un grand nombre de kystes et faisant passer des courants lents de solutions de diverses concentrations, on peut observer différentes phases de la plasmolyse. Une solution de concentration légèrement inférieure à la concentration limite ne produit aucun changement dans l'état des kystes. Pour une concentration un peu plus forte, on voit le protoplasme d'un certain nombre d'entre eux abandonner sur une surface peu étendue la paroi du kyste et dessiner en ce point un contour concave (voir planche, fig. 4). On se rend compte alors, en faisant un peu rouler les kystes avec précaution, que la plasmolyse se manifeste sur un nombre d'individus un peu plus considérable qu'on ne le penserait d'abord, parce

que la calotte le long de laquelle le protoplasme et la paroi sont détachés peut être vue de côté ou être placée au-dessus ou en dessous, points où elle est moins nettement visible. Si la concentration augmente encore, le décollement doit d'abord grandir, puis peut se faire en plusieurs points jusqu'à réduire le protoplasme d'une partie très sensible de son volume primitif. Cependant ce protoplasme n'est pas largement vacuolaire comme celui des cellules végétales, et l'on ne peut ici, comme on a voulu le faire ailleurs, expliquer la plasmolyse par un échange entre les « tonoplastes » de la cellule et le milieu extérieur. Les échanges d'eau ne peuvent avoir lieu dans le cas présent qu'entre la masse protoplasmique même et le milieu extérieur, ou mieux, si l'on attribue au protoplasme une structure finement alvéolaire, entre le liquide des alvéoles et ce milieu extérieur. Tout en pensant que les tonoplastes jouent, là où ils existent, un rôle important, nous devons conclure que leur présence n'est pas nécessaire à la manifestation du phénomène plasmolytique.

On peut aisément aussi, sur les kystes, mettre en évidence le phénomène inverse qui ramène le protoplasme de la cellule à son volume primitif, lorsque l'on vient à remplacer la solution plasmolysante par de l'eau pure ou seulement par une solution d'une concentration plus faible que la solution-limite. L'expérience se dispose de la même manière que précédemment en remplaçant les solutions les unes par les autres sous le microscope : pour cela, on ajoute d'un côté du couvre-objet quelques gouttes de la solution nouvelle et l'on aspire lentement l'ancienne de l'autre côté avec un fragment de papier buvard.

Pour ce qui concerne la comparaison de différentes substances au point de vue de leur pouvoir plasmolysant sur les kystes d'amibes, voici comment on peut opérer. Entre les solutions qui plasmolysent franchement et la solution-limite qui plasmolyse extrêmement peu, il y a toute une zone de passage établie par des solutions qui donnent une plasmolyse plus ou moins étendue ou, quand elle l'est très peu, visible sur un nombre plus ou moins grand d'individus. Cette zone est assez étroite, puisque les concentrations extrêmes peuvent être, pour une même substance, représentées par les nombres 14 et 17.

Mais on peut apprécier, avec une plus grande sensibilité, l'état de plasmolyse des kystes pour une concentration de la

zone de passage, et un observateur un peu exercé reconnaît facilement à 1/15 près la concentration d'une solution qui détermine une plasmolyse d'une certaine intensité. On peut ainsi, en employant un sel déterminé, établir l'échelle suivante :

Azotate de calcium.

Concentration = 12,8.....	pas de plasmolyse.
13,7.....	plasmolyse très légère de quelques kystes.
14,6.....	plasmolyse nette.
15,5.....	— assez intense.
16,4.....	— très forte.

Pour comparer différents sels entre eux, je n'ai pas eu recours à l'analyse chimique, mais, prenant des sels purs et bien cristallisés, j'en ai fait des solutions dont j'ai mesuré la température de congélation. L'appareil employé pour mesurer ces températures était un appareil de Raoult. On déterminait le refroidissement par l'évaporation d'éther. On n'appréciait que le 50e de degré. Comme j'ai noté sous le nom de concentration l'abaissement de la température de congélation exprimée en 1/10 de degré, le chiffre décimal comporte une erreur de 1 à 2/10. La température de congélation n'a pas été prise directement pour chaque concentration, mais seulement, sauf quelques vérifications, pour deux solutions extrêmes. Les autres étaient obtenues par mélange de ces solutions et l'on admettait que pour ces intermédiaires l'abaissement de la température de congélation pouvait être obtenu par interpolation, ce qui, entre — 1 et — 2°, peut être considéré comme exact[1]. Voici les résultats de quelques mesures faites avec des kystes de la même culture que précédemment :

Oxalate de potassium.

C = 11,6.....	pas de plasmolyse.
12,4.....	— —
13,2.....	— —
14......	plasmolyse légère.
14,8.....	— nette.
15,6.....	— intense.
16,4.....	— très forte.

Chlorure de sodium.

C = 13.......	pas de plasmolyse.
14,2.....	plasmolyse légère.
15,4.....	— assez intense.
16,6.....	— très forte.

Chlorure de baryum.

C = 13,2.....	pas de plasmolyse.
14,1.....	plasmolyse légère.
15.......	— nette.
15,9.....	— forte.
16,8.....	— très forte.

1. La précision de la méthode plasmolytique, avec quelque sorte de cellule qu'on opère, est très limitée. La comparaison avec des températures déterminées avec une très grande rigueur serait illusoire.

On peut conclure de ces mesures que, dans la limite de sensibilité du procédé employé, des solutions salines, ayant une même température de congélation, sont isotoniques vis-à-vis des kystes d'amibes.

VIII

PRÉPARATION DE LA DIASTASE DES AMIBES

A. Récolte des amibes. — Lorsqu'on veut récolter les cultures d'amibes cultivées sur gélose dans des boîtes plates de manière à avoir le plus grand nombre possible d'individus mobiles bourrés de vacuoles digestives, il faut le faire généralement vers le 6e jour de la culture, alors que la surface de la gélose a pris un aspect uniforme. En attendant plus longtemps, on récolterait surtout des kystes et la culture serait pauvre en diastase. Avec environ 50 c. c. d'eau qu'on agite rapidement à l'intérieur de la boîte, on enlève un très grand nombre d'amibes. On peut s'aider d'un râcloir en verre ou en fil de fer, mais on risque alors, si l'on n'opère avec de grandes précautions, d'enlever un peu de gélose dont on ne se débarrasse qu'incomplètement par des tamisages du liquide. Le liquide chargé d'amibes est porté dans une deuxième boîte, dans une troisième et ainsi de suite. On peut procéder à un second lavage des boîtes. On réunit tous les liquides obtenus.

On ne peut récolter les amibes sans une masse d'eau relativement fort considérable. Il faut ensuite enlever la plus grande partie de cette eau. C'est à quoi l'on arrive par une centrifugation. Les amibes, dont la densité est plus grande que celle de l'eau, se précipitent au fond. La précipitation des microbes a lieu aussi, mais elle est beaucoup moins rapide. On peut donc obtenir au fond du tube un dépôt assez cohérent d'amibes alors que le liquide qui surnage et qui en est débarrassé est complètement troublé par les bactéries. Avec la petite centrifugeuse à eau que j'employais, l'opération demandait une heure environ. On doit alors décanter le liquide avec précaution. Au fond du tube, on obtient un dépôt mou, blanc s'il est formé d'amibes mobiles presque exclusivement, au contraire jaune brun à la base s'il contient une assez forte proportion de kystes qui se préci-

pitent les premiers. Le dépôt contient encore un assez grand nombre de microbes pour que, si on le délaye dans l'eau et qu'on le soumette à une deuxième centrifugation, on obtienne encore au-dessus du dépôt d'amibes un liquide assez trouble. Néanmoins les amibes constituent de beaucoup la masse prépondérante d'un tel dépôt, et si on en étale une petite quantité entre deux lames de verre sous le microscope, on voit toutes les amibes, leurs pseudopodes rétractés et pressées les unes contre les autres, devenues polygonales par pression réciproque et offrant alors un aspect analogue à celui d'un parenchyme végétal. On reconnaît cependant très bien dans chacune d'elles le noyau, les vacuoles digestives et la vacuole pulsatile. C'est de ce dépôt que nous allons nous servir pour la préparation de la dias tase. La quantité naturellement variable de dépôt que l'on obtient peut être évaluée en moyenne à 1/4 de c. c. par boîte. Il faut d'ailleurs employer souvent d'assez grandes quantités de culture pour avoir de la diastase en quantité appréciable, et certaines expériences rapportées ci-dessous ont exigé l'emploi de 20 boîtes à elles seules.

B. Préparation de l'extrait glycériné. — La centrifugation terminée, le dépôt doit être traité immédiatement. On décante le liquide et on y ajoute quelques (2 à 3) c. c. de glycérine pour 1 c. c. d'amibes. On a soin de bien délayer de façon que la glycérine pénètre bien dans tous les amas. Si l'on regarde au microscope une goutte de ce liquide très trouble, on y voit flotter quantité d'amibes fortement ratatinées par la forte plasmolyse qu'a déterminée l'action du réactif. On peut en débarrasser dès lors la glycérine par une centrifugation. Le liquide glycérique contient dès ce moment la diastase protéolytique dont nous devons maintenant étudier les propriétés. On ne se débarrasse pas toujours à ce moment des corps d'amibes, mais souvent seulement quand on dissout plus tard la diastase dans l'eau. L'extrait glycériné peut être conservé quelque temps à la glacière. Il vaut mieux néanmoins en faire usage le plus rapidement possible.

C. Préparation du liquide diastasique. — Pour obtenir une solution aqueuse active à partir de l'extrait glycériné précédent, on ajoute à 10 c. c. de cet extrait environ 50 c. c. d'alcool à 90°. Il se fait presque aussitôt un abondant précipité floconneux que 10 minutes de centrifugation précipitent en une masse

parfaitement cohérente. On décante rapidement l'alcool et on redissout aussitôt le précipité dans l'eau ; de même que tous les corps semblables, il perd en effet très rapidement son pouvoir diastasique par un contact prolongé avec l'alcool. On obtient un liquide trouble contenant encore en suspension avec les corps d'amibes un certain nombre de bactéries tuées par les opérations précédentes. On peut éliminer par une centrifugation rapide un certain nombre de ces éléments figurés. On filtre ensuite sur papier. Les cadavres d'amibes sont arrêtés. La filtration est lente et l'on est obligé de changer le papier plusieurs fois. Le liquide qui passe reste légèrement louche et contient encore de nombreux corps bactériens. Mais, conservé au laboratoire, il s'éclaircit complètement dans l'espace d'une nuit. J'aurai l'occasion de revenir sur ce sujet.

D. Choix des cultures a employer pour l'étude des diastases. — Il n'est pas indifférent, pour l'étude des diastases que fournit l'amibe, de se servir de cultures où elle est accompagnée de telle ou telle espèce bactérienne. Il ne faut pas en effet que la diastase observée puisse être attribuée aux bactéries qui servent de proie à l'amibe. Les expériences dont je vais parler ci-après ont été faites avec une diastase obtenue dans des cultures pures mixtes d'amibes et de *Bacterium coli commune*, espèce connue comme très peu capable de protéolyse, qui ne liquéfie pas la gélatine dans ses cultures et ne s'*autolyse* pas, tandis que les espèces bactériennes très protéolytiques, comme par exemple le *B. anthracis* ou le vibrion cholérique, sont détruites, digérées par leurs propres diastases quand, après les avoir émulsionnées dans l'eau, on les tue à l'aide du chloroforme.

IX

ACTION PROTÉOLYTIQUE DE L'AMIBODIASTASE.

Le liquide diastasique que nous avons obtenu et que nous appellerons pour abréger l'« amibodiastase », nom qui lui a été donné par M. Metchnikoff dans son ouvrage sur l'*Immunité dans les maladies infectieuses*, se montrera surtout actif sur les albuminoïdes. C'est ce qu'il était permis de prévoir si la dias-

tase est bien celle que contiennent les vacuoles digestives dont l'animal est bourré au moment où, par une brusque immersion dans la glycérine, nous l'avons tout à coup tué. Le liquide des vacuoles digestives digère en effet normalement des bactéries. C'est donc sur les albuminoïdes que nous étudierons d'abord son action.

A. Action sur la gélatine. — Bien que ce corps soit peut-être quelque peu éloigné de ceux dont l'amibe fait ordinairement sa nourriture, la facilité avec laquelle on peut observer la liquéfaction de la gélatine, la généralité avec laquelle toutes les diastases protéolytiques la dissolvent, devaient nous porter à étudier d'abord sur elle l'activité de l'amibodiastase. Le temps plus ou moins long que demande pour se solidifier à une basse température donnée une gélatine imparfaitement digérée fournit aussi un repère commode de l'activité plus ou moins grande d'une diastase affaiblie. — Les recherches ont été faites avec une gélatine à 20 0/0 qu'on ramenait pour l'usage, par l'addition de diastase, d'eau, etc., à 10 0/0. On y ajoutait comme antiseptique une petite quantité de thymol. Dans quelques expériences de contrôle, on a remplacé le thymol par le chloroforme ou le xylol sans obtenir des résultats différents.

Pour vérifier l'action de l'amibodiastase sur la gélatine, il suffit de préparer deux tubes semblables contenant, en présence de la gélatine, respectivement la même quantité de diastase fraîche et de diastase chauffée 5 minutes à l'ébullition. Après quelques heures de séjour à l'étuve à 37°, le contenu du tube où l'on a mis la diastase fraîche ne se solidifie plus. Dans l'autre tube, au contraire, la gélatine se prend en gelée aussi facilement qu'avant l'opération.

On ne peut en aucune façon attribuer cette action à une diastase que pourrait sécréter le coli-bacille qui accompagne l'amibe dans les cultures. J'ai déjà rappelé que ce microbe ne liquéfie pas la gélatine dans les cultures qu'on en fait sur ce milieu. Si l'on fait des expériences directes de contrôle, soit à l'aide de macérations de microbes dans l'eau chloroformée, soit en traitant par la glycérine des microbes raclés d'une culture sur gélose comme je l'ai fait pour les amibes, on constate que les liquides obtenus n'ont sur la gélatine aucune action liquéfiante. Il en résulte que l'action observée précédemment reste tout entière

imputable à une sécrétion des amibes. Étudions maintenant les conditions de cette action.

a) *Influence de la réaction du milieu.* — Nous rappelons que l'emploi de réactifs introduits dans les vacuoles digestives des amibes avait conduit un grand nombre d'auteurs à penser que la diastase qui y existe agissait dans les mêmes conditions que la pepsine. Voyons quelle réaction manifestera le milieu où se liquéfiera la gélatine sous l'influence de l'amibodiastase. Au lieu d'employer pour constater cette réaction le tournesol, je prendrai deux autres matières colorées, dont l'une vire pour une acidité plus grande, l'autre pour une acidité plus faible du milieu. Ce sont le méthylorange et la phénolphtaléine. Nous amenons deux masses égales de gélatine par addition respective d'acide phosphorique et de soude, la première à être acide au méthylorange et la deuxième à être alcaline à la phtaléine. Dans l'un et l'autre cas, le virage doit être dépassé de peu. Nous mêlons alors les deux gélatines dans diverses proportions qu'on peut représenter de la manière suivante, les deux liquides étant représentés par les lettres A et B.

5 c. c. A + acide, — 5 c. c. A, — 4 c. c. A + 1 c. c. B, — 3 A + 2 B, — 2 A + 3 B, — A + 4 B, — 5 B, — 5 B + soude.

On porte à l'étuve à 37° pendant 17 heures, — puis pendant 13 heures encore à 28°. Des tubes témoins contenant de la diastase bouillie avaient été adjoints aux tubes contenant de la diastase active. Voici les temps de solidification qui furent observés dans cette expérience :

Tube.	Temps de solidification. Après 17 h.	Après 30 h.
—	—	—
5A + acide	5′	6′
— témoin	5′	6′
5A	6′	6′
4A + B	7′	6′
3A + 2B	11′	∞
2A + 3B	∞	∞
— témoin	2′	2′
A + 4B	∞	∞
5B	∞	∞
5B + soude	2′	2′

L'expérience achevée, il fut vérifié que 5 A était acide au méthylorange, 5 B légèrement acide à la phénolphtaléine. Il en résulte que la diastase employée a liquéfié la gélatine dans des

milieux acides à la phtaléine, mais alcalins au méthylorange. A la vérité, il y a eu un peu de liquéfaction même au delà de l'acidité au méthylorange, mais elle n'a pas été plus considérable que celle qu'on observe dans le tube témoin de même réaction et elle témoigne seulement que l'acidité du milieu suffit à liquéfier la gélatine. Cette action mise à part, il est facile de tirer du tableau précédent que c'est surtout entre la neutralité à la phénolphtaléine et la neutralité au tournesol (correspondant à peu près au mélange 2 1/2 A + 2 1/2 B) que la diastase se montre active.

Son activité se manifeste encore dans des milieux légèrement acides néanmoins au tournesol. Des expériences analogues qu'il est inutile d'exposer en détail confirment ce résultat. A la vérité, nous ne pouvons pas conclure *de plano* des résultats qui nous sont fournis par la gélatine à ceux que nous donneraient d'autres matières albuminoïdes. Celles-ci devront être étudiées à leur tour.

b) *Influence de la température sur la destruction de la diastase.* — On sait que les diverses diastases sont toutes détruites par la chaleur, mais à des températures assez différentes. J'ai étudié de la manière suivante la destruction de l'amibodiastase par le chauffage. Des tubes contenant chacun un même volume (1 c. c.) de solution diastasique diluée dans un même volume d'eau (5 c. c.) sont soumis pendant trois quarts d'heure à des températures élevées différentes. Dans tous ces tubes, la réaction du liquide est la même (comprise entre la neutralité au tournesol et à la phtaléine du phénol). Après chauffage et refroidissement on ajoute à chaque tube une même quantité de gélatine, et tous les tubes sont portés à l'étuve à 37°. On les reprend au bout de 16 heures et, les plongeant dans l'eau froide, on compte le temps que met à se solidifier le contenu des divers tubes. Voici les résultats obtenus dans cette expérience.

Tubes	chauffés	3/4 d'heure	à 100°. —	Temps	de solidification.	3′ 1/2.
—	—	—	à 67°. —	—	—	3′ 1/2.
—	—	—	à 63°. —	—	—	3′ 1/2.
—	—	—	à 59°. —	—	—	5′
—	—	—	à 55°. —	—	—	∞
—	non chauffés		....	—	—	∞

L'expérience, plusieurs fois répétée avec des résultats analogues, montre bien l'affaiblissement considérable que la diastase

subit déjà au-dessous de 59°. Au-dessus de 60°, son activité disparaît complètement. Mais même au-dessous de 55°, l'activité de la diastase est déjà atténuée par la chaleur, et après un chauffage de trois quarts d'heure à 54°, on peut voir que la puissance de la diastase est devenue sensiblement égale à 1/10 de sa valeur primitive. C'est ce qu'il est facile de constater en ajoutant à la gélatine des quantités décroissantes de diastase fraîche ou chauffée et examinant pour tous les tubes en même temps les durées de solidification. Voici les résultats obtenus dans une telle expérience :

Diastase chauffée à :	Quantité de diastase.	Temps de solidification.
100° pendant 5'............	2 c. c.	2'
62° — 45	2 c. c.	2'
59° — —.............	2 c. c.	3'
54° — —.............	1 c. c. 1/2.	18'
— — —.............	1 c. c.	7'
— — —.............	1/2 c. c.	4
— — —.............	1/4 c. c.	3'
Non chauffée................	1/2 c. c.	∞
—	1/8 c. c.	10'
—	1/16 c. c.	5'
—	1/32 c. c.	3'1/2

Ainsi l'amibodiastase se montre, au moins dans son action sur la gélatine, d'une très grande sensibilité à une élévation de température, même peu considérable, semblable en cela aux « alexines » contenues dans le sérum sanguin des mammifères et dont la température de destruction se montre tout aussi peu élevée.

c) *Influence de la température sur l'activité de la diastase.* — Des tubes contenant tous des quantités égales de diastase et de gélatine et dont l'un avait été porté pendant quelques instants à l'ébullition pour servir de témoin ont montré que l'activité de la diastase est plus forte au-dessus qu'au-dessous de 25°. Ainsi, tandis que le tube témoin se solidifiait en 2 minutes, deux tubes laissés quelques heures à 45° et à 37° restaient indéfiniment liquides dans les mêmes conditions, et un autre tube abandonné pendant le même temps à environ 20° faisait prise en 10 minutes. Mais l'activité de la diastase ne doit devenir nulle qu'à une température assez basse : c'est ainsi qu'un tube préparé de la même façon que les précédents, mais refroidi aussitôt et conservé 24 heures à 8°, a été réchauffé côte à côte avec un témoin le temps nécessaire à la liquéfaction de la gélatine. Celle-ci faisait prise ensuite par refroi-

dissement en 4 minutes dans le tube conservé à 8°, en 2 minutes dans le témoin. Il paraissait bien *a priori* qu'il devait en être ainsi, car, à cette température, la vie des amibes se manifeste parfaitement et leur diastase doit être capable de digérer, dans ces conditions, les proies ingérées. En revanche, aux températures élevées, la diastase se montre active à des températures qui déjà sont très nuisibles aux amibes.

d) *Produits de digestion de la gélatine.* — Il ne semble pas que, au moins dans les conditions où je me suis placé, la transformation de la gélatine par la diastase protéolytique extraite des amibes soit poussée très loin. Il est vrai que je me suis servi d'un extrait diastasique faible ajouté en petite quantité à une grande quantité de gélatine, pour ne pas avoir à tenir compte des produits solubles (albumoses ou peptones) que la solution diastasique elle-même pourrait contenir. J'ai opéré sur environ 18 c.c. de gélatine à 20 0/0 approximativement. Cette gélatine ayant été maintenue quelques jours à l'étuve à 37° en présence de la diastase (avec addition d'une petite quantité de thymol) a été ensuite traitée par le formol, d'abord à la température ordinaire, ensuite à 110°. Après 10 heures d'action, le produit est complètement sec : on en a recueilli 3^{gr}, 28. On épuise par l'eau sur un filtre taré : celui-ci retient 0^{gr},7 de matière représentant la gélatine non transformée. Le liquide filtré et partiellement évaporé est précipité par le sulfate d'ammoniaque à saturation. Le filtrant à nouveau, on obtient un liquide qui ne contient pas sensiblement de peptones, car il ne donne pas la réaction du biuret. Bien que cette réaction ait pu être gênée par la grande quantité de sulfate d'ammoniaque présente dans la liqueur, elle se serait produite cependant dans ces conditions si la quantité de peptones avait été tant soit peu considérable, et il semble bien, vu l'abondance du précipité produit par le sulfate d'ammoniaque, que celui-ci a entraîné sensiblement toutes les matières dissoutes. Ainsi l'action de la diastase paraît s'être arrêtée, au moins en très grande partie, à l'état de transformation peu profonde qui caractérise les « albumoses ». Peut-être ces produits sont-ils assimilables directement par la cellule amœbienne. Au reste, des matières analogues à la gélatine doivent se rencontrer rarement dans la nutrition naturelle des amibes, et nous verrons l'amibodiastase pousser plus loin la

transformation d'autres albuminoïdes plus voisins de ceux qui forment leur nourriture ordinaire. J'ai surtout mis, comme je l'ai dit, la gélatine en tête de cette étude à cause de sa facile liquéfaction et de la possibilité de caractériser par des chiffres l'intensité des actions obtenues.

J'ai cherché encore avec la gélatine si l'on pouvait mettre en évidence l'action d'une *sensibilisatrice*, si, par un chauffage ménagé de la diastase, on obtiendrait comme avec le sérum sanguin un liquide inactif par lui-même, mais capable d'augmenter l'activité du liquide non chauffé. Le chauffage a été fait à 60° pendant trois quarts d'heure. On a fait les mélanges suivants, volume à volume : liquide non chauffé + liquide chauffé à 100° (1) ; non chauffé + chauffé à 60° (2) ; chauffé à 60° + chauffé à 100° (3) ; 2 volumes de liquide chauffé à 100° (4). Agissant sur des quantités égales de gélatine, les tubes (1) et (2) ont donné ensuite le même temps de solidification ; — (3) et (4) (témoin) ont donné le même temps. On n'a donc pu mettre en évidence ainsi aucune sensibilisatrice.

B. Action sur la fibrine. — La fibrine sur laquelle a été essayée l'action de la diastase est de la fibrine de porc conservée dans la glycérine et chauffée pendant 2 heures à 58° dans la solution physiologique de NaCl à 7 0/00. On sait que cette précaution est indispensable à la correction des expériences. Non chauffée, la fibrine entraîne avec elle, en se séparant du sérum sanguin, une diastase protéolytique qui la dissout spontanément quand on la met à l'étuve en présence de solution physiologique et d'un peu de chloroforme. Chauffée à une température supérieure à 58°, la fibrine change évidemment d'état d'agrégation. Elle devient plus dure et cassante et elle est plus difficilement attaquable. Le chauffage ménagé indiqué ci-dessus et qui suffit à empêcher la digestion chloroformique de la fibrine, tout en la laissant bien attaquable par les diastases protéolytiques, est donc à employer [1].

L'action de l'amibodiastase sur la fibrine ainsi préparée m'a d'abord paru nulle. C'est que je plongeais la fibrine dans la solution diastasique faite avec de l'eau distillée. En remplaçant celle-ci par la solution physiologique de sel marin à 7 0/00, on

1. Ce procédé, recommandé par M. Delezenne, a déjà été employé par M. Mesnil dans son travail sur les *Diastases des Actinies*.

obtient au contraire, à l'étuve à 37°, une dissolution très nette et très rapide de la fibrine. Certainement ce résultat peut être attribué en partie à l'altération que subit la fibrine quand on la maintient au contact de l'eau distillée, et il est certain que dans ces conditions elle devient moins attaquable. Je ne pense pas toutefois que la totalité du phénomène doive être expliquée de cette manière, car même la fibrine, maintenue quelque temps dans l'eau distillée, se laisse bien dissoudre ensuite par la diastase en solution salée, et l'on est ainsi conduit à admettre l'influence très grande du sel sur l'action de la diastase. Cette influence, dont M. Duclaux a souvent signalé l'importance à propos d'autres actions diastasiques, apparaît ici avec la plus grande netteté. En comparant l'influence que la présence du sel exerce sur l'action de l'amibodiastase avec celle qu'elle a sur une pepsine ou une trypsine commerciale, on constate que cette influence est ici beaucoup plus grande. Peut-être faut-il admettre que les diastases qui agissent intracellulairement ont des conditions d'action plus étroites, sont moins souples que les diastases extracellulaires qui forcément agissent souvent dans des milieux de composition un peu plus variable.

Comme nous l'avons fait pour la gélatine, nous allons étudier pour la fibrine les principales influences qui modifient l'activité de la diastase. Les détails nombreux que nous avons donnés à propos de la digestion de la gélatine nous permettent d'être ici plus bref et nous insisterons seulement sur les phénomènes nouveaux que nous rencontrerons.

a) *Influence de la réaction du milieu.* — La réaction du milieu qui convient à la digestion de la gélatine par l'amibodiastase convient aussi à la digestion de la fibrine. La digestion est donc nulle lorsque l'alcalinité est supérieure à celle qui fait virer la phénolphtaléine. En deçà de cette limite jusqu'à la neutralité au tournesol et même un peu au delà, il y a digestion. L'action cesse lorsqu'on s'approche du virage au méthylorange, et pour une acidité supérieure à celle qui produit ce virage, la fibrine se trouve bien gonflée par l'acide, mais nullement digérée par la diastase. Ainsi le résultat obtenu d'abord avec la gélatine se maintient vrai avec un albuminoïde incontestable.

b) *Influence de la température sur l'activité et la destruction de la diastase.* — L'amibodiastase se montre active sur la fibrine

aux mêmes températures que sur la gélatine. Je n'ai pas vérifié toutefois son activité au voisinage de 10°. Les mêmes chauffages qui affaiblissent et détruisent l'action sur la gélatine agissent de même à l'égard de la fibrine. Ainsi l'activité se trouve très réduite à 58° et nulle au-dessus de 60°. Je n'ai donc rien à ajouter sur ce point aux résultats obtenus plus haut.

c) *Fixation de la diastase sur la fibrine.* — L'amibodiastase se fixe sur la fibrine comme le font généralement les diastases qui attaquent cette substance. Plaçons dans deux tubes deux fragments égaux de fibrine. Dans le premier, mettons de l'eau physiologique, dans le deuxième de la diastase dissoute dans le même liquide. Abandonnons les deux tubes quelques heures à la glacière, puis changeons de tube nos flocons de fibrine et portons le tout à l'étuve. Le fragment qui a pu s'imprégner de diastase dans le deuxième tube se dissout dans le premier. L'autre se trouve à l'étuve dans le deuxième tube dont la diastase a été enlevée et reste tout à fait ou presque inaltéré.

d) *Produits de digestion de la fibrine.* — Lorsque la fibrine se trouve placée à l'étuve dans le liquide diastasique, elle devient d'abord grisâtre et très friable. Elle ne tarde pas, si l'on agite le tube qui la contient, à se résoudre en une poudre grise contenant souvent des fragments plus ou moins gros et qui se précipite au fond. Lorsque la quantité de diastase est suffisante, la fibrine altérée finit par disparaître presque complètement. Certainement la diastase que j'ai obtenue n'a pas l'activité de la trypsine, par exemple, et l'on a quelque peine à mettre en évidence les produits de dégradation avancée de la fibrine.

Je n'ai jamais obtenu ces très abondants cristaux de tyrosine que l'on rencontre dans les digestions trypsiques. Toutefois, en évaporant doucement le liquide de digestion, on peut mettre en évidence l'existence de ce produit. On obtient alors de petits cristaux très peu solubles dans l'eau froide, mais solubles dans l'eau chaude et dans l'ammoniaque d'une part, dans les acides de l'autre. Enfin et surtout, ces cristaux, quoique petits, présentent bien la forme caractéristique en double éventail qui ne laisse aucun doute sur leur nature. Je rappelle que M. Mesnil n'a pu obtenir aussi que de fort petits cristaux de tyrosine par l'action de l'actinodiastase sur la fibrine, bien que la digestion fût parfaitement nette.

Une réaction qui a donné au même auteur les meilleurs résultats a également très bien réussi avec les produits de digestion de la fibrine par l'amibodiastase. C'est la réaction du *tryptophane* ou *bromkörper*, corps qui accompagne toujours la tyrosine dans les digestions trypsiques, et que l'on ne trouve pas dans les digestions pepsiques. Le liquide de digestion de la fibrine auquel on ajoute de l'eau de brome fraîchement préparée prend une coloration d'abord rose, qui devient violette en même temps qu'il se forme de légers grumeaux. Ces grumeaux violets finissant par se précipiter laissent parfaitement incolore le liquide surnageant. Cette réaction, que V. Harlay a récemment indiquée comme caractérisant très nettement les digestions trypsiques, rapproche bien, comme un certain nombre d'autres caractères déjà étudiés, l'amibodiastase de la trypsine. Je n'insisterai pas ici sur les ressemblances que tous ces caractères lui donnent avec l'actinodiastase de Mesnil et les autres diastases intracellulaires, me réservant de faire plus loin cette comparaison.

Des expériences de contrôle ont naturellement été faites avec la fibrine comme avec la gélatine pour mettre en évidence s'il n'y avait aucune action digestive due aux microbes accompagnant les amibes. Ni dans les cultures en bouillon chloroformées et portées à l'étuve, ni dans le liquide obtenu de la même manière que l'amibodiastase avec le produit de râclage de cultures en gélose de *B. coli*, je n'ai obtenu de digestion de fibrine, et l'action ici encore doit bien être tout entière rapportée à l'amibe.

C. Action sur l'albumine. — J'ai fait quelques expériences sur la digestion de l'albumine cuite très finement émulsionnée que l'on peut obtenir en coagulant par la chaleur du blanc d'œuf dilué dans l'eau et amené d'abord à la neutralité au tournesol. Bien que cette émulsion soit très fine et présente par suite une large surface d'attaque à l'action digestive, cependant le changement observé dans l'émulsion après un certain nombre d'heures d'étuve, quoique net, reste toujours faible.

On a pu l'observer de la manière suivante : deux tubes semblables sont placés côte à côte, contenant la même quantité d'émulsion et de diastase et ne différant que parce que dans l'un (témoin), le liquide diastasique a été préalablement bouilli.

Les deux tubes sont identiquement troubles après le mélange, et après 16 heures d'étuve, il y a éclaircissement du tube contenant la diastase active, ce qu'on peut constater par comparaison. On peut conclure de ceci que l'action de la diastase sur un albuminoïde coagulé par la chaleur est faible. La digestion des microbes nous conduira à la même conclusion.

D. Action sur les microbes. — L'amibodiastase dissout très activement les corps de microbes morts. Lorsque, dans la préparation du liquide diastasique, on filtre sur papier, j'ai déjà dit qu'on obtient un liquide encore troublé par des corps bactériens immobiles et que ce liquide, abandonné à lui-même sur la table du laboratoire, s'éclaircit spontanément en 12-24 heures. On n'observe pas que les microbes se soient précipités, et après agitation, le liquide reste parfaitement limpide. Si d'ailleurs, pendant l'éclaircissement du liquide, on en fait de temps à autre des préparations microscopiques, on voit les microbes se réduire d'abord à l'état de granules, puis disparaître petit à petit du liquide. Or le *coli-bacille* est un microbe qui ne secrète que peu ou pas de diastase protéolytique et est incapable de subir l'autolyse comme cela arriverait, par exemple, avec le *B. anthracis* : un liquide chloroformé dans lequel on fait macérer du *coli-bacille* reste indéfiniment trouble. La dissolution des corps microbiens dans ces conditions ne peut être attribuée qu'à la diastase sécrétée par l'amibe.

On a pu, en faisant expérimentalement agir la diastase sur des émulsions très fines de corps microbiens, obtenir la dissolution de ces corps. Si, par exemple, nous ajoutons, dans deux tubes à essai contenant la même quantité de liquide diastasique et dans l'un desquels le liquide a seulement été bouilli (témoin), un même nombre de gouttes d'une émulsion de coli-bacille tenue quelque temps au contact du chloroforme, les deux tubes, qui sont d'abord d'une égale opacité, présentent, après quelques heures de séjour à l'étuve, une différence bien nette ; le liquide devenant, dans celui où la diastase est active, d'abord transparent et même ensuite complètement limpide si la quantité de diastase employée est assez considérable.

On a répété avec le coli-bacille des expériences analogues à celles qui avaient été faites avec la gélatine et la fibrine, dans le but de connaître les conditions dans lesquelles s'accomplit cette

protéolyse. Ces conditions se sont montrées identiques à celles où se manifeste sur d'autres substances l'activité de l'amibo-diastase.

a) *Influence de la réaction du milieu.* — Par l'addition d'une petite quantité d'acide phosphorique dilué d'une part, de soude caustique d'autre part, on amène deux parties d'une même émulsion de coli-bacille tué par un contact prolongé avec le chloroforme, respectivement à la neutralité au méthylorange et à la phénolphtaléine. Les deux liquides, après avoir été additionnés de quantités égales de liquide diastasique, sont mêlés dans diverses proportions. Appelant A le liquide acidulé, B le liquide alcalinisé, nous pouvons représenter ainsi le contenu des divers tubes où nous plaçons ces mélanges :

5 A, 4 A + B, 3 A + 2 B, 2 A + 3 B, A + 4 B, 5 B

Le virage du tournesol se place au voisinage (un peu à droite) de 3 A + 2 B. L'éclaircissement a été maximum dans 2 A + 3 B, un peu plus faible dans 3 A + 2 B et A + 4 B. Il était encore plus faible dans 5 B (un peu moins alcalin que le virage de la phtaléine), et nul dans 5 A (un peu moins acide que le virage du méthylorange). Nous pouvons représenter ces résultats dans le tableau suivant :

	Virage du méthylorange.	
5A...............	éclaircissement	nul.
4A + B...........	—	médiocre.
3A + 2B..........	—	assez grand.
	Virage du tournesol.	
2A + 3B..........	—	maximum.
A + 4B...........	—	assez grand.
5B...............	—	médiocre.
	Virage de la phtaléine.	

La réaction optima coïncide donc bien avec celle qui a été déterminée pour les autres substances étudiées.

b) *Températures d'activité et de destruction de la diastase.* — La diastase se montre active sur le coli-bacille dans les mêmes conditions que pour les substances précédemment étudiées, c'est-à-dire jusqu'au delà des températures qui sont fatales à l'amibe. — Pour rechercher quelle température détruisait la diastase agissant sur le microbe, on a encore employé la même émulsion de coli-bacille tué par le chloroforme qui a servi aux expériences précédentes. Le liquide diastasique a été chauffé à différentes

températures pour les différents tubes d'essai, puis additionné dans chaque tube d'une égale quantité d'émulsion de coli-bacille. Après 20 heures à l'étuve à 37°, les tubes sont examinés : le résultat de cet examen est consigné dans le tableau suivant :

Température et durée du chauffage.	Résultat obtenu.	
5 minutes à 100° (témoin)......	éclaircissement	nul.
45 — à 62°...............	—	—
45 — à 56°...............	—	intermédiaire.
Pas de chauffage préalable......	—	complet.

Cette expérience, bien moins précise que celle qui a été faite avec la gélatine, en corrobore tout à fait les résultats.

c) *Action de la diastase sur diverses espèces microbiennes.* — On pouvait se demander si la diastase de l'amibe nourrie de coli-bacille depuis un certain temps dissout ce microbe de préférence à tout autre. Pour répondre à cette question, on devait mettre en présence de la diastase amœbienne des microbes morts de diverses espèces, de manière à en former des émulsions également opaques, puis on devait chercher si toutes s'éclaircissaient à l'étuve et dans quel ordre. Cette expérience comporte une cause d'erreur avec un grand nombre d'espèces qui, au contraire du coli-bacille, sécrètent de grandes quantités de diastase protéolytique. Lorsqu'on tue ces microbes au moyen du chloroforme, cette diastase fait subir aux corps microbiens une « autodigestion » ou « autolyse » à laquelle j'ai déjà fait allusion, et qu'il faut éviter si l'on veut que l'expérience soit correcte. On est alors conduit à chauffer ces émulsions microbiennes pour en détruire la diastase. Mais on se heurte alors à une autre cause d'erreur, parce que de cette manière on coagule plus ou moins les albuminoïdes dont les microbes sont formés et on les rend ainsi moins sensibles à l'action de la diastase. J'ai rangé ci-dessous par ordre d'éclaircissement des tubes les noms des microbes mis en expérience, avec l'indication du mode de préparation de l'émulsion, en commençant par le microbe le plus facilement dissous :

B. coli commune (chloroformé).			
B. typhique (chloroformé).			
Staphylocoque doré	(chauffé à 100°,	puis	chloroformé).
Vibrio Metchnikovi	—	—	—
B. anthracis, var. asporogène	—	—	—

On voit que les microbes chauffés sont moins facilement dissous que ceux qui sont simplement tués par le chloroforme. J'ai d'ailleurs pu constater que le coli-bacille lui-même est moins facilement dissous après un moment d'ébullition de l'émulsion. Cela n'empêche pas ces microbes de présenter entre eux des différences assez considérables au point de vue de leur dissolution, le *B. anthracis*, par exemple, n'étant sensiblement pas attaqué, tandis que le staphylocoque montre une dissolution nette. On ne peut tirer argument de la digestion du *B. coli*, plus facile que celle du staphylocoque, pour affirmer une adaptation de la diastase, les microbes ne se trouvant pas présentés dans les mêmes conditions. On peut remarquer toutefois que le *B. coli* est un peu plus facilement dissous que le B. typhique, espèce très voisine et préparée de la même manière.

Après avoir constaté la digestion par l'amibodiastase des corps microbiens tués par la chaleur ou par le chloroforme, il s'imposait de rechercher son action sur les microbes vivants. C'est ce que j'ai tenté de faire sans succès. Le *B. coli* vivant, émulsionné dans l'eau stérile ou dans la solution physiologique stérile, et auquel on ajoute de la diastase, n'est pas détruit par un séjour prolongé à l'étuve.

La diastase extraite des amibes ne présente non plus, vis-à-vis des microbes, aucun pouvoir agglutinant, ce qui est curieux si l'on rapproche ce fait de l'agglutination très nette que l'on peut constater autour de la vacuole pulsatile. Il faut peut-être conclure de là que la matière agglutinante est exclusivement due à la vacuole pulsatile, que les vacuoles digestives n'en contiennent pas et qu'elle est rapidement fixée par les microbes.

J'ai recherché également sans succès si le sérum des animaux immunisés contre le *B. coli* contiendrait une sensibilisatrice capable d'exalter l'action de l'amibodiastase sur les émulsions chloroformées de ce microbe. Un sérum de cheval immunisé m'a été procuré par M. Lesage : ce sérum avait sur le *B. coli* un pouvoir agglutinant très manifeste. Ajouté à la diastase, il ne paraît pas augmenter la rapidité de l'éclaircissement de la dissolution. Mais les tubes en expérience sont difficiles à comparer, à cause du phénomène d'agglutination qui ne se présente pas dans le témoin.

APPENDICE

Recherche d'autres diastases. — J'ai cherché à mettre en évidence dans l'amibodiastase la présence de diastases non protéolytiques. Je n'ai pu obtenir de saponification appréciable de la monobutyrine. En revanche, l'iode et la liqueur de Fehling permettent de constater la présence d'une petite quantité d'amylase. Mais cette diastase ne peut être sûrement rapportée a l'amibe, car le *B. Coli* en produit aussi.

On peut faire la même observation à propos de la présure dont la présence dans l'amibodiastase peut être constatée.

X

L'AMIBODIASTASE EST BIEN LA DIASTASE INTRACELLULAIRE DES AMIBES

L'amibodiastase dont j'ai indiqué le mode de préparation et étudié les actions est bien une diastase extraite de l'amibe, comme je l'ai montré plus haut en faisant voir que les cultures pures du microbe accompagnant l'amibe sont incapables de donner un produit agissant semblablement. Ni émulsion ni culture en bouillon de *B. coli* ne nous ont donné de diastase active. J'expose ici quelques expériences qui permettront de mieux voir encore que la présence et la quantité d'amibodiastase sont liées à la présence et à l'abondance d'amibes dans un milieu donné.

Ces expériences ont été faites, non à l'aide d'extrait glycériné, mais avec des émulsions dans l'eau de microbes et d'amibes tués par le chloroforme.

Un dépôt centrifugé d'amibes, préparé comme pour le traitement par la glycérine et traité par le chloroforme après émulsion dans l'eau (ou la solution physiologique), donne un liquide dissolvant la gélatine et la fibrine.

Le liquide chargé d'amibes, que l'on recueille des boîtes de culture, traité par le chloroforme, dissout la gélatine. Il fait subir à la fibrine un commencement de digestion : la fibrine devient grise et friable et tombe en petits morceaux au fond du tube où l'on fait l'expérience

Le même liquide décanté après centrifugation et traité de la même manière est dépourvu de toute action sur la gélatine et la fibrine.

∴

Non seulement cette diastase vient de l'amibe, mais encore nous devons la considérer comme la diastase intracellulaire que l'on voit agir sur les matières alimentaires dans les vacuoles digestives. Je voudrais établir ici qu'il y a accord à ce sujet entre les observations microscopiques et celles que j'ai pu faire *in vitro*, et que les propriétés attribuées à l'une et à l'autre permettent de conclure à leur identité.

J'ai montré que l'amibodiastase est surtout protéolytique. Elle agit sur la gélatine, sur la fibrine et sur les corps de microbes morts, en milieu alcalin, neutre ou légèrement acide au tournesol, mais toujours alcalin au méthylorange et acide à la phtaléine. En agissant sur la fibrine, elle donne de la tyrosine.

La diastase, dont les effets ont été étudiés au microscope, est aussi surtout protéolytique. Elle ne paraît digérer ni les graisses, ni sensiblement l'amidon. Une propriété importante semble d'abord la différencier de notre amibodiastase; elle dissout les albuminoïdes en milieu acide; au moins écrit-on ainsi souvent. Il serait plus exact de dire qu'elle digère en milieu plus acide que le liquide extérieur où vivent les amibes, et ce liquide est généralement fort alcalin.

Nous avons précédemment constaté, à l'aide du rouge neutre, comme on l'a fait auparavant avec le tournesol ou l'alizarine sulfoconjuguée, l'acidification progressive des vacuoles digestives. C'est là un fait qui doit être mis hors de doute. Mais nous avons vu que Le Dantec, par exemple, n'était pas le plus souvent arrivé à déceler cette acidification avec le tournesol, et qu'il avait dû pour cela employer un réactif capable d'indiquer une acidité beaucoup plus petite.

On sait que dans l'eau pure dans laquelle on fait dissoudre une petite quantité de soude, l'addition d'acide chlorhydrique amène à un certain moment un passage brusque à la réaction acide, que tous les réactifs colorants indiquent sensiblement au même moment.

Au contraire, par l'addition d'acide phosphorique, le passage de l'une à l'autre réaction se fait par deux ressauts brusques[1] que sépare une sorte de plateau incliné; ces deux ressauts correspondent respectivement à l'addition dans la liqueur de 1/2 et de 1 molécule-gramme d'acide phosphorique pour 1 molécule-gramme de soude, et entre eux l'acidité du liquide n'augmente que lentement. La plupart des acides polybasiques donneraient lieu à un phénomène analogue. De même le mélange d'un acide fort et d'un acide faible. Bref, si l'on se trouve en présence d'un mélange complexe de bases et d'acides forts et faibles, on pourra, par addition d'acide, ne passer de l'alcalinité forte à l'acidité forte que par une sorte de rampe inégale de forme variable suivant les mélanges et dont les divers réactifs colorés indiqueront les différents points. Les réactifs qui virent pour une acidité au voisinage de laquelle l'augmentation est lente dans le milieu considéré ne donneront qu'un virage lent et progressif.

C'est ce qui arrive toujours dans les liquides chargés de matières organiques tels que ceux dans lesquels vivent les amibes. C'est ce qui arrive assurément aussi à l'intérieur de leurs vacuoles digestives. Là, comme dans le liquide ambiant, il y a certainement toujours une certaine quantité de phosphates. La présence de sels à composants (acides ou bases) plus ou moins forts ou faibles, et notamment de phosphates, explique l'existence de ces *zones sensibles* dont Le Dantec parle à propos de l'alizarine sulfoconjuguée et que l'on peut retrouver pour les autres réactifs qui ont servi de réactifs physiologiques[1]. Ces substances : l'alizarine, le *neutralroth*, le tournesol, présentent ce caractère commun, lorsqu'on les met dans une solution de soude qu'on acidifie petit à petit avec de l'acide phosphorique,

1. Je parle ici de l'acidité et de l'alcalinité comme de grandeurs numériquement définies susceptibles de croître ou de décroître. Il faut rappeler que des notions de physico-chimie sur lesquelles je n'ai pas à insister permettent en effet de déterminer numériquement l'acidité d'un liquide. On peut alors tracer des courbes d'acidification des liquides par addition d'un acide. C'est à ces courbes que correspondent les expressions de ressaut, de plateau, etc. Voir les courbes de Böttger : *Zeitsch. f. physik. Chemie*, XXIV, p. 295.

1. En réalité, on se trouve toujours dans la pratique placé dans le cas d'un mélange d'acides forts et faibles, même lorsqu'on mêle de l'acide sulfurique à de la soude, celle-ci introduisant toujours un peu d'acide carbonique dans le mélange. C'est pourquoi ce mélange a fourni à Le Dantec avec l'alizarine une zone sensible appréciable.

de présenter à un moment un virage assez brusque précédé ou suivi d'une série de teintes qui vont se succédant l'une à l'autre par transitions insensibles. J'ai cru bon de résumer dans un tableau les variations des teintes de ces différents réactifs dans les conditions que je viens d'indiquer. En présence de mélanges complexes d'électrolytes tels que les présentent les milieux naturels, le tableau pourrait se modifier un peu, mais son allure générale serait certainement conservée.

QUANTITÉ de soude.	MÉTHYLORANGE	ALIZARINE	TOURNESOL	ROUGE NEUTRE	PHTALÉINE du phénol.
0 c. c. 9				Rouge vineux.	
1		jaune orangé pâle.	Rouge franc.		
1,1		**Virage complet.** Rouge orangé.			
1,2	**Virage.**			Zone sensible (la sensibilité décroît vers le *haut* du tableau).	
1,3		Zone sensible (la sensibilité décroît vers le *bas* du tableau.)	Zone sensible.		
1,4					
1,5					
1,6					
1,7					
1,8			Violet lilas. **Virage.** Bleu.		
1,9					
2					
2,1					
2,2				Orangé. **Virage.** Jaune pâle.	**Virage.**
2,3		Teinte rouge vineux.			
2,4					

J'ai opéré de la manière suivante. A 1 c. c. d'acide phosphorique déci-normal, j'ajoutais des quantités de soude déci-normale variant de 0 c. c. 9 à 2 c. c. 4. J'ajoutais ensuite des quantités d'eau distillée suffisantes pour amener tous les liquides au même volume de 8 c. c. Dans chacun des liquides obtenus on mettait une goutte du réactif colorant et l'on faisait ainsi des séries de tubes que l'on comparait. On a noté comme repères les points de virage du méthylorange et de la phénolphta-

léine qui, comme on le sait, sont très nets dans les mélanges d'acide phosphorique et de soude, et correspondent précisément aux deux ressauts indiqués de l'acidité, c'est-à-dire à la présence de 1 ou 2 molécules-grammes de soude dans le liquide pour 1 d'acide phosphorique.

Ce sont toujours des teintes de cette zone sensible comprise entre l'alcalinité du biphosphate et l'acidité du monophosphate de sodium que les auteurs ont observées dans les vacuoles digestives des amibes. Nous rappelons que c'est précisément dans cette zone, et plutôt dans la moitié inférieure (alcaline) que se manifeste la digestion des matières protéiques par notre amibodiastase. Nous nous croyons donc autorisé à conclure que ses propriétés sont celles de la diastase intracellulaire et qu'elle lui est identique à l'activité près.

XI

COMPARAISON DE L'AMIBODIASTASE AVEC LES AUTRES DIASTASES INTRACELLULAIRES

La première diastase à laquelle il convient de comparer l'amibodiastase est certainement la diastase liquéfiant la gélatine que Beyerinck a vue excrétée par son *A. zymophila*. Nous avons dit que cette diastase, que l'auteur n'a d'ailleurs pas obtenue en assez grande quantité pour opérer *in vitro*, liquéfie de préférence la gélatine lorsque le microbe qui accompagne la levure ne secrète pas d'acide, d'où il conclut que cette diastase est une trypsine. Il est à supposer, avec l'auteur, que cette diastase est versée dans le milieu extérieur lorsque les vacuoles digestives sont expulsées, ce qui la ferait tout à fait analogue à notre amibodiastase. Pour s'assurer si sa trypsine n'est pas accompagnée de sucrase ou d'amylase, Beyerinck emploie ce procédé très ingénieux d'essayer de cultiver dans le milieu où vit l'amibe un microbe (mycoderme) qui a besoin de glucose et ne secrète ni sucrase ni amylase. En introduisant dans la culture pour tout aliment hydrocarboné du sucre de canne ou de l'amidon, on connaît par le développement ou le non-développement de ce microbe si

l'amibe lui a préparé l'aliment nécessaire. Or, il n'en est rien. Comme notre amibodiastase, la diastase de Beyerinck ne contient donc sensiblement qu'un ferment trypsique.

On sait qu'aucune diastase n'a été jusqu'à ce jour isolée des Infusoires ciliés pour les mêmes raisons qui en rendent l'extraction chez les amibes fort laborieuse. Je rappellerai seulement que les observations microscopiques la font très proche parente de la diastase des amibes. Comme elle, elle paraît surtout être protéolytique, puisque ce n'est qu'exceptionnellement qu'on a pu voir des grains d'amidon attaqués chez les ciliés. Encore n'étaient-ils pas dissous ou seulement très peu, mais transformés en une matière qui devenait rouge brun par l'iode. Les réactifs colorants indiquent dans les vacuoles une acidité semblable à celle qu'on voit chez les amibes, parfois un peu plus forte puisqu'il arrive assez fréquemment que le tournesol vire au rouge franc, l'alizarine au jaune.

Chez les Eponges, une extraction de la diastase n'a été faite que par Krukenberg. Il a conclu successivement à l'existence chez ces êtres d'une diastase pepsique, puis trypsique. Mais ces résultats semblent douteux et auraient besoin d'être confirmés. Récemment, Cotte[1] a confirmé l'existence d'une trypsine des éponges, mais ces résultats mériteraient aussi d'être précisés. Krukenberg a aussi extrait d'un plasmode de Myxomycète (*Æthalium septicum*) une diastase qu'il dit pepsique.

En revanche, chez les Actinies, Mesnil, dans un travail récent déjà cité, a montré l'existence d'une diastase digestive intracellulaire à la fois protéolytique (trypsique), et aussi présurante, lipasique et faiblement amylolytique. Au point de vue de la réaction des vacuoles, les réactifs colorants indiquent encore ici une acidité plus grande que celle du milieu extérieur, mais faible et ne dépassant pas celle du monophosphate de sodium : le rouge neutre prend une teinte rouge vif dans les vacuoles des cellules des filaments mésentériques et le tournesol communique aux mêmes tissus une couleur lilas. Ces indications concordent bien avec celles que fournit l'étude *in vitro* de la zone d'activité de la diastase.

Les indications fournies par les réactifs colorants (tournesol et rouge neutre) chez les Turbellariés, dont on n'a pas encore tenté

1. Cotte, Notes sur le *Suberites domuncula*, thèse de médecine, Paris (1901).

d'extraire de diastases, assignent à leur protéase une zone d'action placée assez bas dans le tableau établi ci-dessus[1].

Quant aux leucocytes des Mammifères, dans lesquels plusieurs travaux ont démontré la présence de l'amylase[2], on sait peu de choses de leurs protéases. D'un pus de l'hypopion qu'il a vérifié stérile, Leber[3] a pu faire un extrait qui digérait la fibrine coagulée à 25° et liquéfiait la gélatine. Des leucocytes du pus également, Achalme[4] a extrait un liquide doué de plusieurs propriétés diastasiques différentes. Avant tout, ce liquide est protéolytique et digère les différents albuminoïdes en milieu alcalin, neutre ou légèrement acide au tournesol, c'est-à-dire qu'il est encore trypsique. Il présente cette particularité curieuse de ne digérer la gélatine qu'en milieu salin.

Si nous comparons aux deux types classiques de la pepsine et de la trypsine des Vertébrés supérieurs toutes celles des diastases intracellulaires que l'on connaît bien, nous sommes amenés à conclure qu'elles se rattachent toutes au type trypsique, c'est-à-dire qu'elles digèrent en milieu alcalin, neutre ou faiblement acide et poussent assez loin la désagrégation de la molécule albuminoïde, jusqu'à des corps cristallisés tels que la tyrosine. Notre amibodiastase n'échappe pas à cette règle.

Les indications que donnent les virages des réactifs colorés placent d'ailleurs dans la même zone de réaction l'activité des diastases intracellulaires que l'on n'a pas aussi bien étudiées.

Au reste, le type trypsique semble être très répandu dans les deux règnes de la nature. En dehors de la trypsine des vertébrés supérieurs, on rencontre des protéases de ce type dans des groupes d'animaux très divers : Annélides (lombric et *Nereis*), Crustacés (écrevisse), Insectes et Arachnides, etc.[5], et aussi chez des végétaux (latex du *carica papaya*, du figuier, jus de l'ananas, *Aspergillus niger*, etc...) A coup sûr, ces diastases présentent entre elles des différences notables. Les unes ont leur optimum

1. Metchnikoff et Mesnil ont vu que le virage du tournesol dans les vacuoles digestives est exceptionnel; en revanche, Metchnikoff a observé le virage du rouge neutre.

2. Voir Metchnikoff, *L'Immunité dans les maladies infectieuses*, Paris (1901), p. 102.

3. Leber, *Die Enstehung der Entzündung*. Leipzig (1891), p. 508

4. Achalme, *C. R. Soc. Biol.* (1899), p. 568.

5. Pour la bibliographie des diastases digestives, voir Richet, *Dict. de physiologie*. Article : digestion (Hédon).

d'action pour une réaction un peu plus acide, les autres pour une réaction plus alcaline. Il en est, comme l'endotrypsine des levures de Hahn et Geret[1], qui, aux dépens des matières albuminoïdes, donnent bien de la leucine et de la tyrosine, mais pas de peptones, alors que les autres en produisent.

Plus les études sur ce sujet deviendront nombreuses, plus il apparaîtra certainement qu'il existe des variétés de protéases différentes par les conditions ou par les produits de leur action. Il n'en est pas moins vrai qu'elles se groupent bien sous les deux rubriques classiques et que, dans la nature, les trypsines semblent être de beaucoup les plus répandues. Les diastases pepsiques, au contraire, digérant en milieu fortement acide et ne poussant pas la simplification de la molécule albuminoïde au-delà des peptones, peuvent être considérées comme exceptionnelles.

CONCLUSIONS

Je résume les résultats obtenus dans ce travail :

J'ai isolé du sol une espèce d'amibes que j'ai cultivée sur des milieux solides et j'ai étudié son mode de développement dans ces cultures (multiplication et enkystement).

J'ai donné un procédé pour isoler cette amibe en présence d'une seule espèce bactérienne, qu'on peut d'ailleurs faire varier.

Cette amibe agglutine les microbes (*B. coli*) dont elle est nourrie, grâce à la sécrétion de la vacuole pulsatile. J'ai insisté sur l'intérêt de ce phénomène.

Le *rouge neutre* m'a permis de suivre au microscope l'acidification progressive des vacuoles.

Des colorations faites après fixation ont montré à l'intérieur de ces vacuoles les modifications que subissent les microbes ingérés.

J'ai étudié la pénétration par osmose dans l'amibe de quelques matières colorantes et leur fixation sur le noyau. J'ai montré aussi que le protoplasme des amibes (au moins à l'état de kystes) n'est pas facilement perméable aux solutions salines puisqu'il

1. Hahn et Geret, *Zeitschr. f. Biologie* (1900), t. XL, p. 118.

se comporte vis-à-vis d'elles comme une membrane semi-perméable et permet de mesurer correctement l'isotonie des solutions.

Enfin j'ai extrait des amibes cultivées une diastase surtout protéolytique qui se rapproche de la trypsine, tant par sa réaction *optima* que par les produits de son activité. J'ai d'ailleurs établi par des expériences de comparaison que le microbe qui l'accompagne dans les cultures (*B. coli*) n'est pour rien dans la production de cette diastase.

Comparant les résultats de ces expériences *in vitro* avec les observations faites *in vivo*, j'ai été amené à conclure que la protéase extraite des amibes est bien celle qui agit à l'intérieur de leurs vacuoles digestives.

La longueur des manipulations nécessaires pour se procurer une quantité peu considérable de diastase explique que je n'aie encore pu suivre dans tous ses détails l'action de cette substance. J'espère toutefois avoir apporté une contribution utile à l'histoire encore peu connue des diastases intracellulaires.

Que mes anciens maîtres qui m'ont ouvert leurs laboratoires, MM. Ed. Perrier et Costantin, veuillent bien recevoir ici mes plus sincères remerciements. MM. Duclaux, Roux et Metchnikoff m'ont accueilli à l'Institut Pasteur et m'ont souvent soutenu de leurs encouragements et aidé de leurs conseils. Qu'ils me permettent de leur en témoigner ma profonde reconnaissance. M. le docteur Borrel a bien voulu exécuter les dessins qui accompagnent ce mémoire; M. Delezenne m'a souvent donné au cours des expériences de très utiles indications; M. Mesnil m'a fait profiter de l'expérience que lui a donné un travail récent sur un sujet voisin. Je suis heureux de pouvoir ici les en remercier tous trois.

EXPLICATION DE LA PLANCHE VII

Lettres communes à toutes les figures : *n*, noyau ; *k*, karyosome du noyau ; *ect*, ectoplasme ; *end*, endoplasme ; *vd*, vacuole digestive ; *vc*, vacuole contractile ; *m*, membrane du kyste.

Fig. 1. — Amas de kystes d'amibes dans une culture sur gélose de 10 jours.

Fig. 2. — Groupes de kystes de l'amas précédent pour montrer l'aspect polygonal du contour des kystes pressés les uns contre les autres. Gr. = 650 env.

Fig. 3. — Kyste isolé coloré par le rouge de ruthénium. Gr. = 650.

Fig. 4. — Kyste plasmolysé par une solution de sel marin.

Fig. 5. — Amibe nourrie de *B. coli* et plongée dans une solution faible de *neutralroth*. Les microbes, dans plusieurs vacuoles digestives, sont colorés par le rouge (*a*). Au voisinage de la vacuole pulsatile s'est formé un amas de microbes agglutinés. Gr. = 1,000 env.

Fig. 6. — Amibes mobiles nourries de *B. coli* dans une solution faible (2/1000) de rouge de ruthénium. La couleur n'a pas encore pénétré les amibes; les microbes libres dans le liquide et ceux qui sont agglutinés au voisinage de la vacuole pulsatile ont pris la couleur. Gr. = 850 env.

Fig. 7. — Amibe colorée vivante par le bleu de méthylène. La teinte a dû être changée dans la figure. Le karyosome doit être bleu pâle, les microbes se teignent en bleu foncé. Gr. = 1,100.

Fig. 8. — Amibe colorée sans fixation par le rouge de ruthénium.

Fig. 9. — Amibes colorées après fixation (alcool : 10 minutes) par la méthode de Laveran. Dans 9 *a*, on voit plusieurs vacuoles digestives contenant des microbes (staphylocoques) à différents états de digestion de plus en plus avancés (dans l'ordre 1, 2, 3). Dans 9 *b*, on voit bien l'aspect que prend ordinairement le noyau par cette coloration. Gr. = 1,100.

Fig. 10. — Une colonie microbienne dans une culture où l'on a ensemencé des amibes en un point extérieur à cette colonie. Les amibes ont atteint la colonie et ont semé en tous sens autour d'elle un grand nombre de colonies secondaires.

ACTION DU SÉRUM SANGUIN

SUR LES PARAMÉCIES

Par le Dr LEDOUX-LEBARD

(Travail du laboratoire de M. le Dr Roux.)

Les infusoires se prêtent bien à l'étude des substances toxiques pour leur organisme. Beaucoup d'entre eux sont visibles à de faibles grossissements. Ils sont mobiles et l'altération de leur motilité devient un signe, facile à observer, de l'influence du poison. Celui-ci, chez les infusoires très différenciés, peut agir, en outre, sur les différents organes : vésicules contractiles, portion mobile de l'endosarc, couche à trichocystes, cils vibratiles dont il modifie la forme ou le fonctionnement.

Nous étudierons, dans ce mémoire, l'action sur les paramécies du sérum sanguin de quelques espèces animales.

Raab [1] a constaté que des paramécies qu'il avait mises dans du sérum humain, dans le but de rechercher l'action de la fluorescence, sont mortes en 15 minutes, et en 30 minutes lorsque ce sérum était mélangé d'eau, à parties égales. Il ne put démontrer aucune action de la lumière et conclut que la substance qui, dans le sérum, tue les paramécies est inconnue. Faisons observer que l'eau physiologique tue également les paramécies dont le contenu est isotonique, d'après Balbiani [2] avec une solution de chlorure de sodium à 0,30 pour 100. Il faut donc employer le sérum en dilution étendue, lorsqu'on veut étudier son pouvoir toxique sur ces infusoires.

Mme Metchnikoff [3] a essayé l'action, sur les paramécies, du sérum d'anguille. « Celui-ci n'a point manifesté de pouvoir toxique supérieur à celui du sérum sanguin d'autres animaux ».

1. *Zeitschr. f. Biolog.*, XXIX Bd, 4 Heft, 1900.
2. *Arch. d'Anat. microscop.*, 1898, p. 547.
3. Citée dans l'*Immunité dans les maladies infectieuses*, par E. Metchnikoff, p. 22.

Les paramécies dont nous nous sommes servi pour nos expériences appartenaient à l'espèce *P. caudatum*. Elles étaient cultivées suivant le procédé indiqué par Balbiani [1]. Autant que possible, on n'utilisait que les cultures contenant de 500 à 1,000 paramécies par centimètre cube.

La technique est simple : on prépare dans un verre de montre un mélange d'eau et de sérum et l'on ajoute la culture de paramécies. Ces liquides sont dosés exactement, avec une pipette graduée en dixièmes de centimètre cube. Le volume total du liquide ne doit pas dépasser 2 c. c. à 2 c. c. 5, pour être facilement explorable. Le verre de montre est placé dans une chambre humide.

Étudions d'abord l'action du sérum de cobaye qui reproduit, avec des différences en plus ou en moins, l'ensemble des effets obtenus avec les autres sérums.

On prépare une dilution n° 1 de sérum de cobaye, à 1/20 de c. c. de sérum pour 1 c. c. du mélange.

N° 1.

Eau	18/10 c. c.
Sérum de cobaye	1/10 c. c.
Culture	1/10 c. c.

Les paramécies nagent d'abord avec agilité ; au bout de 10 à 30 minutes, leurs mouvements se ralentissent, un grand nombre tombent au fond du liquide tandis que d'autres continuent à nager. Bientôt, toutes sont au fond, immobilisées avec des mouvements sur place ou progressant lentement.

Pendant cette phase de ralentissement et d'immobilisation apparaît, à l'extrémité postérieure de chaque paramécie, une masse floconneuse, irrégulière, de forme variable, très petite d'abord, augmentant peu à peu de volume et acquérant des dimensions qui peuvent atteindre environ le tiers du volume de l'infusoire. Celui-ci traîne cette masse dont il parvient quelquefois à se débarrasser, soit par une nage plus rapide, soit par des mouvements alternatifs de progression et de recul ; ou bien la masse se fragmente, des portions se détachent et le fardeau est ainsi allégé, mais seulement pour quelques instants, car il ne tarde pas à s'accroître d'un nouvel apport de matières. La masse est visqueuse ; pendant la progression, elle s'étire sou-

1. *Loc. cit.*

vent en un long filament qui semble partir de l'extrémité postérieure de la paramécie ; l'autre bout est libre ou relié au gros de la masse, ou bien encore celle-ci se fractionne en renflements successifs. Cette disposition en chapelet aide à découvrir des filaments qui, par leur ténuité, et leur transparence pourraient échapper à l'observation.

Nous reviendrons, dans un instant, sur l'origine et la composition de ces masses adhérentes. Continuons maintenant l'observation des paramécies gênées dans leurs mouvements par de telles entraves, affaiblies ou paralysées par suite de l'action du sérum.

Elles nagent de plus en plus lentement au fond du liquide. Deux d'entre elles se rencontrent. Leurs extrémités antérieures se dégagent encore assez bien des masses visqueuses, mais lorsque celles-ci se mettent en contact, elles s'accolent en une masse unique qui lie les paramécies l'une à l'autre par leurs extrémités postérieures. Elles tirent, chacune de leur côté, en ligne droite et en sens opposé. Cédant à cette traction, le lien s'allonge et se rompt quelquefois, libérant les paramécies. Le plus souvent, elles restent unies. D'autres surviennent et se laissent prendre de même par leurs masses visqueuses. Ainsi se forment des agglomérations étoilées ou rayonnantes de 3, 4 ou d'un plus grand nombre de paramécies. Celles-ci sont disposées comme les rayons d'une sphère, les extrémités antérieures libres, à la périphérie, les extrémités postérieures réunies au centre par les masses visqueuses confluentes. C'est une disposition analogue à celle des agglomérations en rosace des trypanosomes, décrites par Laveran et Mesnil [1].

Les agglomérations nombreuses offrent une disposition plus ou moins irrégulière. D'ailleurs, l'agglutination entre paramécies se complique de l'agglutination avec des corps étrangers qui peuvent se trouver dans la préparation ; dépôts de la culture, brins de coton, etc. Ces corps ténus s'attachent aux masses visqueuses et sont entraînés par la paramécie, lorsqu'elle possède encore assez de vigueur. Si le poids est trop lourd, ou la force épuisée, c'est la paramécie qui reste attachée au corps étranger. Il est fréquent de voir des fragments de fibres végétales auxquels plusieurs paramécies sont appendues par leurs

1. Ces *Annales*, 1901, n° 9, et 1902, n° 1.

extrémités postérieures, au moyen des masses adhérentes, comme les fruits d'une grappe à leur axe.

Au terme de cette période d'agglutination commencée vers la fin de la première heure, achevée dans la deuxième ou troisième heure, plus tôt ou plus tard suivant l'activité du sérum, l'aspect de la préparation est bien différent de celui de la période précédente. Plus de paramécies nombreuses nageant rapidement dans les diverses couches du liquide comme au début, ou lentement au fond, mais seulement des paramécies agglutinées en agglomérations rayonnantes ou irrégulières, d'autres attachées à de petits corps étrangers, quelques-unes seulement ayant échappé à l'agglutination, toutes gisant inertes au fond du liquide.

Les paramécies n'ont pas encore cessé de vivre. A de forts grossissements on constate des mouvements de rotation autour du grand axe ou de faibles déplacements. Les vésicules pulsatiles se contractent, bien que plus rarement, la cyclose de l'endosarc persiste, les cils vibratiles continuent leurs oscillations. Bientôt, les vésicules contractiles se paralysent, elles présentent une dilatation considérable souvent limitée à l'une d'elles, tout mouvement cesse, le corps se déforme et devient ovoïde.

Au bout de 24 heures, les 50 ou 60 paramécies contenues dans la préparation sont presque toutes mortes. Quelques-unes seulement ont résisté, sans avoir acquis, pour cela, l'immunité contre l'action d'une nouvelle dilution de sérum à 1/20.

Pour avoir une notion plus précise de l'activité du sérum de cobaye, on a préparé en même temps que la dilution n° 1 d'autres dilutions n° 2, n° 3, n° 4, n° 5. Elles diffèrent de la dilution n° 1 seulement en ce que, au lieu de 1/10 c. c. de sérum, on a mis dans n° 2, 1/10 c. c. de sérum dilué à 1 : 2; dans n° 3, 1/10 c. c. de sérum dilué à 1 : 4; dans n° 4, 1/10 c. c. de sérum dilué à 1 : 8; dans n° 5, 1/10 c. c. de sérum dilué à 1 : 16. Le volume du liquide étant 2 c. c., on voit que ces dilutions contiennent respectivement, par centimètre cube : n° 1, 1/20 c. c.; n° 2, 1/40 c. c.; n° 3, 1/80 c. c.; n° 4, 1/160 c. c.; n° 5, 1/320 c. c. de sérum.

Le ralentissement, l'immobilisation des paramécies, l'expulsion de masses adhérentes, l'agglutination peuvent s'observer dans les dilutions n° 1, n° 2, n° 3, n° 4. Les phénomènes tardent

d'autant plus à apparaître et à se généraliser à toutes les paramécies que la dilution est plus étendue. Dans le liquide n° 5, on remarque au bout de quelques heures une rapidité un peu moindre des mouvements, et quelques paramécies expulsent des masses visqueuses d'un faible volume. L'action du sérum est donc encore sensible dans la dilution de 1 : 320. Après 24 heures, on trouve des paramécies mortes et d'autres immobiles, dans les dilutions 2, 3 ; la mobilité reste diminuée dans la dilution 4, elle est redevenue normale dans la dilution 5 ; les paramécies agglutinées qui restent vivantes se désagrègent.

Le phénomène de l'expulsion des masses adhérentes exige une étude complémentaire. Ces masses, après leur expulsion, s'attachent à la région postérieure de l'infusoire, par l'intermédiaire des cile vibratiles altérés par le sérum. L'adhérence est souvent limitée à la touffe de cils qui recouvre l'extrémité postérieure. Grâce à des examens répétés, on découvre des paramécies munies de masses étirées en filaments et pour lesquelles cette adhérence aux cils postérieurs ne s'est pas encore établie. Lorsqu'elles nagent en zigzag, on observe, en effet, que le filament ne s'attache pas à l'extrémité postérieure à laquelle il s'applique seulement pendant la progression rectiligne, mais dont il s'écarte au moment des changements de direction. Il s'insère en réalité en avant de cette extrémité, et sous une zone transversale qui est celle assignée à l'anus, sans que nous ayons pu arriver à une détermination plus précise. C'est par cet orifice, croyons-nous, que la masse est expulsée. Notre opinion s'appuie sur les faits que nous allons exposer.

La masse éliminée, lorsqu'elle a acquis un certain volume, s'étale à l'extrémité postérieure de la paramécie, et par suite de ses adhérences aux cils, pendant les mouvements de l'infusoire, elle s'étend plus ou moins vers la région antérieure. Elle s'applique, par sa surface adhérente, à la cuticule dont elle est séparée par une ligne claire répondant au revêtement ciliaire. La surface libre est irrégulière et, lorsque l'expulsion est récente, formée de petites bosselures assez égales dont la présence est liée au mode de formation de la masse. Celle-ci se composait, pour nos paramécies, de petits bâtonnets de 3 μ de longueur formées d'une portion axiale plus réfringente entourée d'une

zone claire. Ces bâtonnets étaient semblables, par leur forme et leur colorabilité, à ceux qui composaient les bols alimentaires circulant dans l'endosarc. Ces bacilles représentaient sans doute l'aliment de choix des paramécies, parmi les microbes qui pullulaient dans la macération de mâche servant de bouillon de culture. Après leur expulsion, ces bols alimentaires incomplètement digérés conservaient plus ou moins longtemps leur forme sphérique et donnaient à la masse adhérente, qui est une masse fécale, son aspect muriforme.

Microbes encore entassés en boule, microbes dissociés sont unis par une substance visqueuse qui nous paraît devoir provenir des vacuoles digestives. Nous ignorons s'il faut y ajouter une portion de la substance sarcodique ; mais nous n'avons pas trouvé dans les matières éliminées de cristaux semblables à ceux qui circulent dans l'endosarc. Enfin, on observe des amas de trichocystes à l'état de spicules intriqués en tous sens et situés à la périphérie ou çà et là, dans l'intérieur des masses adhérentes. Nous avons assisté à une décharge de trichocystes par une paramécie placée dans une dilution de sérum de rat ; il existait une masse adhérente qui fut repoussée à quelque distance.

Tous ces caractères ne s'appliquent qu'aux masses récentes qui viennent d'être éliminées, ils disparaissent en peu de temps parce que les masses se déforment, s'altèrent et perdent leur transparence. Les précipités qui se produisent fréquemment dans les dilutions de sérum peuvent former ainsi, à la surface des paramécies, des dépôts adhérents qu'explique l'altération des cils. Ces dépôts se distinguent des masses que nous venons de décrire par leur opacité, leur composition différente, leur siège dans n'importe quelle région du corps de l'infusoire. Lorsqu'ils occupent un seul côté, ils provoquent des mouvements de rotation uniforme.

L'agglutination des paramécies s'effectue donc par l'intermédiaire de masses visqueuses composées presque en totalité de fèces. Il faut, pour qu'il y ait agglutination, que les matières éliminées aient d'elles-mêmes ou acquièrent, au contact du sérum, le degré de viscosité nécessaire.

L'expulsion de matières se distinguant, par leur abondance, de la défécation normale, peut s'observer, sans qu'il y ait agglu-

tination. Ce qui est particulier ici, c'est la propriété qu'ont les masses expulsées d'adhérer à la fois entre elles et aux paramécies.

Dans une dilution de sérum de rat à 3/20 et aussi à 1/10, nous avons vu les paramécies immobilisées en quelques minutes. Les masses expulsées étaient abondantes, et néanmoins il n'y avait pas d'agglutination, alors qu'elle se produisait dans la dilution du même sérum à 1/40. Le défaut d'agglutination n'était pas attribuable à ce que les paramécies eussent conservé assez de force pour rompre les masses visqueuses par leurs tractions. La diminution de la mobilité était au contraire plus marquée dans les dilutions à 3/20 et à 1/10 que dans celle à 1/40 où l'agglutination existait. D'autre part, il était difficile d'invoquer une insuffisance de la mobilité qui, supprimant les contacts, eût empêché l'agglutination, car celle-ci ne s'est pas produite dans une préparation semblable, malgré l'agitation du liquide.

Il y a donc, outre la composition qualitative de la dilution de sérum, des conditions tenant à la proportion des corps en présence, qui favorisent ou empêchent l'agglutination. Une dose trop forte de sérum supprime le phénomène.

Enfin, en supposant ces conditions remplies : viscosité des masses expulsées les faisant adhérer entre elles et aux paramécies ; viscosité supérieure à la force des paramécies ; l'agglutination se produira-t-elle nécessairement ? Les chances de rencontre des paramécies se mouvant avec lenteur au fond du liquide, sont-elles assez grandes pour réaliser l'agglutination possible, ou faut-il encore supposer une attraction réciproque de ces infusoires ? C'est ce que l'observation ne permet pas de décider.

Les détails qui précèdent nous permettent de résumer très brièvement les résultats obtenus avec d'autres sérums. Comme précédemment, les nombres indiquant les titres des dilutions, donnent en centimètres cubes, le volume du sérum contenu dans 1 c. c. de la dilution. Le mot : immobilisation, signifie que les paramécies, au lieu de nager dans les diverses couches du liquide, sont tombées au fond et ne progressent plus que lentement ou sont tout à fait immobiles.

Sérum de lapin. Sérum de chèvre (un seul essai). — Les sérums à 1/20 ont agi sur les paramécies comme le sérum de cobaye. Mais, pour le sérum de lapin, plus faiblement.

Sérum de cheval. — A 1/20, produit en 2 heures l'immobilisation et l'expulsion de masses fécales. Nous n'avons pas constaté d'agglutination dans les dilutions à 1/20, à 1/10.

Sérum de mouton (un seul essai). — Agglutination faible, en 2 heures, dans la dilution à 1/20. Déformation des paramécies. Mort.

Sérum de bœuf. — Ce sérum est très actif. A 1/20 : immobilisation des paramécies en 15 minutes, expulsion de masses adhérentes, faible agglutination, dilatation excessive des vésicules. Mort en quelques heures.

A 1/40 : immobilisation en 20 minutes suivie d'agglutination.

A 1/200 : immobilisation en 30 minutes, agglutination, mort.

A 1/320 : immobilisation, légère agglutination.

Le sérum de veau (un seul essai) s'est comporté comme celui de bœuf.

Sérum de rat blanc. — Très toxique. A 1/20, 1/40 : immobilisation, expulsion des masses adhérentes, agglutination, dans un intervalle de 20 minutes à 1 heure. Mort des paramécies.

A 1/30, 1/160, mêmes phénomènes, mais un certain nombre des paramécies survivent.

A 1/320, le pouvoir toxique s'est encore manifesté par un ralentissement marqué des mouvements.

Sérum de pigeon (un seul essai). — A 1/20 : immobilisation au commencement de la 2e heure. Expulsion des masses adhérentes. Faible agglutination.

Sérum d'oie (un seul essai). — A 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 : immobilisation au bout de 1 à 4 heures, d'autant plus rapide que la dilution est plus forte. Expulsion de masses adhérentes. Au bout de 24 heures, survie d'un certain nombre de paramécies qui ont recouvré leur mobilité.

Sérum humain. — Nous avons examiné 28 échantillons de sérum humain provenant des services hospitaliers de MM. les docteurs Letulle et Doléris à qui nous exprimons nos bien vifs remerciements. Le sang a été obtenu, soit par l'application de ventouses scarifiées (14 cas) sur des malades atteints d'affections

très diverses, soit par la section du cordon ombilical (14 cas), immédiatement après l'accouchement.

Dans les 14 derniers cas, le sérum s'est montré 10 fois très peu actif dans les dilutions à 1/20 où il ne produisait qu'un peu de ralentissement, quelquefois à peine appréciable, des mouvements, 4 fois actif pour la même dilution. (Immobilisation. Mort des paramécies ou d'un grand nombre d'entre elles au bout de 24 heures.)

Dans la dilution à 1/10, 4 fois sur 5 essais, le sérum était toxique.

Sur les 14 échantillons de sérums pathologiques, 6 fois le sérum s'est montré inactif ou à peu près inactif et 8 fois actif dans la dilution à 1/20.

Cette variabilité du pouvoir toxique n'est point particulière au sérum humain. Nous l'avons constatée pour les sérums de cobaye, de rat, de cheval. Nous sommes porté à croire, d'après nos observations, que lorsqu'il s'agit de sérums normaux, le pouvoir toxique varie, pour une espèce animale, entre des limites assez rapprochées. Parmi les sérums que nous avons étudiés, ceux de bœuf, de rat, d'oie sont les plus toxiques, le sérum humain est celui qui l'est le moins.

Le sérum de cobaye chauffé à 55° pendant une demi-heure perd son pouvoir d'immobiliser et d'agglutiner les paramécies. Déjà, après 10 minutes de chauffage à cette température, ce sérum ne produit plus qu'un ralentissement des mouvements dans les dilutions à 1/20.

A 55°, le sérum de lapin est modifié comme celui de cobaye.

Le pouvoir agglutinant des sérums de cobaye et de lapin, aboli à 55°, se distingue, par cette faible résistance à la chaleur, de la propriété analogue des sérums antimicrobiens; ceux-ci restent agglomérants après le chauffage à 55°.

Le sérum de bœuf, qui est très toxique, conserve encore, lorsqu'il a été soumis à la température de 55°, pendant une demi-heure, une toxicité qui ne disparaît à peu près complètement que par le chauffage à 60° pendant une demi-heure. Pour le constater, on prépare des dilutions à titres croissants, à 1/20, 2/20, 3/20, avec le sérum chauffé à 55° et aussi avec le sérum de bœuf chauffé à 60°. La comparaison des dilutions de

même titre démontre l'influence de la température; celle des dilutions de titres différents permet d'apprécier la toxicité. Or, les paramécies sont plus ou moins complètement immobilisées dans les dilutions de sérum chauffé à 55°; la mobilité persiste dans les dilutions de sérum chauffé à 60°, mais est diminuée dans les deux plus fortes, à 2/20 et 3/20.

La même expérience répétée avec le sérum de cheval et avec celui de cobaye démontre que le premier conserve une légère toxicité après le chauffage à 55°, qui suffit au contraire à supprimer le pouvoir toxique du sérum de cobaye, dans les dilations à 1/20, 2/20, 3/20.

La persistance du pouvoir toxique dans certains sérums après le chauffage à 55° n'est pas en contradiction avec ce que nous savons sur les propriétés des sérums hémolytiques. Lorsqu'on chauffe à 55° un sérum hémolytique pour une espèce d'hématies, ce sérum exerce encore une action sur les cellules; mais à défaut de l'hémolyse qui est le signe utilisé avec le réactif globule rouge, cette action reste latente. La moindre atteinte portée à l'organisme de la paramécie retentit sur la motilité dont l'altération décèle la faible toxicité de certains sérums chauffés. Les choses se passent comme s'il y avait dans ces sérums soit plusieurs substances toxiques destructibles à différentes températures, soit une seule substance toxique donnant, à partir de 55°, des dérivés de toxicité décroissante.

La suppression du pouvoir toxique du sérum sous l'influence de la chaleur conduit à rechercher s'il est possible de faire réapparaître la toxicité, par l'addition au sérum chauffé, d'un autre sérum inactif ou peu actif. Ce dernier est représenté dans l'expérience suivante par un sérum humain inactif à 1 : 20. Le sérum inactivé par le chauffage était du sérum de cobaye porté à 55° pendant une demi-heure.

On prépare les trois dilutions :

N° 1.

Eau	17/10 c. c.
Sérum chauffé de cobaye	1/10 c. c.
Sérum humain	1/10 c. c.
Culture de param.	1/10 c. c.

N° 2.

Eau	16/10 c. c.
Sérum chauffé de cobaye	2/10 c. c.
Sérum humain	1/10 c. c.
Culture de param	1/10 c. c.

N° 3.

Eau	15/10 c. c.
Sérum chauffé de cobaye	3/10 c. c.
Sérum humain	1/10 c. c.
Culture de param	1/10 c. c.

On prépare aussi trois dilutions témoins n° 4, n° 5, n° 6 qui diffèrent de n° 1, n° 2, n° 3, en ce que le sérum humain y est remplacé par la même quantité du même sérum humain chauffé une demi-heure à 55°.

Enfin, une dilution n° 7 est ainsi composée :

Eau	18/10 c. c.
Sérum humain	1/10 c. c.
Culture de param	1/10 c. c.

Voici les résultats observés. Dans les dilutions n° 1, n° 2, n° 3 se produisent, en 3 heures, l'immobilisation avec expulsion de masses adhérentes, l'agglutination des paramécies. C'est dans n° 3 que les phénomènes apparaissent d'abord, puis dans n° 2 et n° 1.

La mobilité des paramécies persiste dans les dilutions témoins n° 4, n° 5, n° 6. Mais on note l'expulsion de masses non adhérentes. Elle persiste également dans la dilution n° 7.

Au bout de 24 heures, toutes les paramécies sont mortes ou encore absolument immobilisées dans n° 1, n° 2, n° 3; elles nagent dans n° 4, n° 5, n° 6, aussi bien que dans n° 7.

Cette expérience ne donne pas la preuve décisive que le sérum chauffé ait été réactivé par le sérum humain. Une autre interprétation est permise. Le sérum humain, bien que non toxique aux doses employées, est plutôt nuisible aux paramécies; le sérum chauffé agit peut-être dans le même sens; ces deux effets, tolérés séparément, peuvent en s'ajoutant l'un à l'autre produire les phénomènes observés.

Nous avons recherché si les paramécies traitées par un sérum chauffé sont devenues plus sensibles à l'action d'une dilution de sérum humain à 1/20 non toxique pour des paramécies neuves.

Après plusieurs essais, nous avons adopté le procédé suivant qui permet de réaliser simplement l'expérience. Des paramécies

sont laissées dans le sérum chauffé de cobaye et dilué à 1/5, pendant environ 1 h. 20 dans une expérience, pendant 2 jours dans une seconde expérience. On transporte ensuite chaque paramécie séparément, au moyen d'une effilure de pipette, dans un verre de montre distinct contenant une dilution de sérum humain à 1/20. Or, les paramécies traitées par le sérum de cobaye ont conservé leur mobilité normale dans cette dilution, aussi bien que des paramécies neuves.

Ce fait négatif justifie les réserves que nous exprimions au sujet de l'interprétation à donner à l'expérience précédente sur le pouvoir toxique du mélange de sérum chauffé et de sérum humain. De nouvelles recherches sont nécessaires pour savoir si l'action du sérum sur les paramécies est comparable à celle d'un sérum hémolytique sur les hématies.

RECHERCHES

SUR LE

MODE DE RÉSORPTION DES CELLULES HÉPATIQUES

INJECTÉES DANS L'ORGANISME

Par le Dr J. CANTACUZÈNE

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Avec les planches VIII et IX.

I

Le problème de la résorption des cellules dans l'organisme sain ou malade préoccupe depuis longtemps les biologistes et l'on connaît déjà le mécanisme suivant lequel disparaissent un grand nombre d'organes larvaires, de cellules affaiblies par l'usure vitale ou de produits pathologiques; les travaux classiques de Kowalewsky, v. Rees, Metchnikoff nous ont appris que l'histolyse larvaire chez les insectes, la résorption de la corde dorsale chez les tuniciers ou celle de la queue chez les batraciens anoures sont l'œuvre de phagocytes d'origine mésodermique. Dans la rate, les ganglions, les capillaires du foie, chez les vertébrés supérieurs, les leucocytes mononucléaires (macrophages) détruisent journellement une quantité considérable d'hématies ou de leucocytes qu'ils englobent et digèrent; les mêmes éléments sont les agents de la résorption ovulaire, ainsi qu'il résulte des recherches d'Henneguy et de plusieurs autres auteurs, entre autres de Matchinsky [1] qui a publié récemment un travail soigné sur cette question; dans un grand nombre de cas pathologiques, les cellules de notre organisme deviennent la proie des phagocytes : ainsi disparaissent les fibres nerveuses, les fibres musculaires, les cellules nerveuses ou les agrégats cellulaires de nouvelle formation (cellules géantes, etc.) qui subissent la transformation dite fibreuse. Les scléroses de tout ordre, qu'il s'agisse de celles qui s'installent à la suite d'intoxications

1. *Ann. Inst. Pasteur*, 1901.

fortuites ou qu'il s'agisse de scléroses séniles, nous apparaissent également aujourd'hui comme le reliquat de la lutte qui s'établit entre certaines cellules de l'organisme d'une part et les macrophages de ce même organisme de l'autre.

Les quelques résultats fournis jusqu'ici dans cet ordre d'idées, par la méthode expérimentale, n'ont fait que rendre plus évident ce rôle des macrophages; lors de ses expériences entreprises dans le but d'étudier le sort de la toxine tétanique injectée dans l'organisme, Metchnikoff[1] vit les cellules nerveuses, introduites dans le péritoine des cobayes, englobées par les macrophages et digérées à leur intérieur. La découverte des cytolysines est venue donner à cette question un nouvel intérêt.

En cherchant à se rendre compte du lieu de l'organisme où s'opère la destruction des spermatozoïdes et des hématies injectées dans le péritoine des cobayes, M. Metchnikoff[2] vit ces éléments détruits exclusivement à l'intérieur des leucocytes, plus particulièrement, des mononucléaires, qui les englobent vivants et les digèrent. Il put se convaincre qu'il n'existe pas dans ce cas de dissolution extracellulaire des produits injectés, et que des diverses parties de la cellule, c'est le noyau qui résiste le plus longtemps à l'action des diastases digestives. Les macrophages bourrés d'inclusions cellulaires rentrent au bout de quelque temps dans les ganglions mésentériques et dans la rate; on les trouve accumulés en grand nombre, surtout dans le premier de ces organes.

La découverte d'un sérum hépatolytique. obtenu à la suite d'injections répétées de cellules du foie d'un animal à une espèce différente, m'a engagé à entreprendre des recherches dans le but d'élucider le mécanisme suivant lequel les cellules hépatiques sont résorbées dans l'organisme. Tillmanns[3], dans un travail, publié en 1879, sur la cicatrisation des plaies du foie, avait déjà observé que des fragments de tissu hépatique introduits dans le péritoine d'un animal étaient rapidement entourés, envahis et pénétrés par des leucocytes; il considérait ces derniers comme les éléments formateurs du tissu fibreux que l'on voit souvent s'organiser autour des fragments injectés.

1. E. Metchnikoff, *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, t. XII, p. 263.
2. E. Metchnikoff, *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, t. XIII, p. 737.
3. Tillmanns, *Virchows Archiv.*, 1879, t. LXXVIII, p. 437.

M. Delezenne[1], en injectant des émulsions de foie de chien à des canards; M. Deutsch[2], en injectant à des lapins du foie de cobaye, sont arrivés, indépendamment l'un de l'autre, à obtenir un sérum spécifiquement toxique pour la cellule hépatique dont il détermine rapidement, *in vivo*, la dégénérescence graisseuse ou la nécrose. M. Delezenne a vu cette action spécifique s'accompagner de phénomènes d'insuffisance hépatique tels que la diminution, dans l'urine, de la proportion d'urée, l'augmentation parallèle des sels ammoniacaux, l'excrétion de quantités notables de leucine et de tyrosine, et, enfin, dans certains cas, l'apparition du sucre.

Moi-même[3] j'avais signalé, à la même époque, le fait que les cellules hépatiques, injectées dans le péritoine, sont détruites à l'intérieur de macrophages isolés ou réunis en cellules géantes, que cette résorption est souvent très lente et n'est parfois pas achevée au bout de 10 semaines.

C'est l'étude détaillée des phénomènes qui accompagnent la résorption expérimentale de la cellule hépatique que je vais présenter ici. J'ai étudié cette résorption dans deux cas : 1° dans celui où l'espèce qui a fourni le foie et celle qui a reçu l'injection sont très voisines l'une de l'autre dans la série animale : tels sont le lapin et le cobaye; 2° dans celui où les deux espèces appartiennent à des groupes très éloignés; c'est ainsi que j'ai observé le mode de destruction du foie de grenouille, injecté dans le péritoine des cobayes ou dans les veines des lapins. J'ajouterai que tandis que les cobayes supportent assez facilement l'injection du foie de lapin, lapins et cobayes sont au contraire très sensibles à l'injection du foie de grenouille. Cette injection s'accompagne souvent de phénomènes toxiques graves, tels que anémie rapide et cachexie aboutissant à la mort au bout de 1-3 semaines. Il faut donc, lorsque l'on veut renouveler les injections, procéder avec une extrême prudence, n'injecter au début que de très faibles doses (1/2 foie de grenouille à la fois pour commencer) et préparer 24 heures à l'avance l'animal au moyen d'injections intrapéritonéales et intraveineuses faites avec

1. Delezenne, Sérum antihépatique. *C. R. du Congrès international de médecine*, Paris, 6 août 1900. Delezenne, *C. R. Acad. Sciences*, 11 août 1900.
2. L. Deutsch, *C. R. du Congrès internat. de médecine*, 4 août 1900.
3. J. Cantacuzène, *C. R. du Congrès internat. de médecine*, Sect. de bactériologie, p. 56.

la solution physiologique de NaCl, suivant que l'on veut injecter le foie dans le péritoine ou dans les veines. En prenant ces précautions, on arrive à vacciner les animaux et à obtenir un sérum spécifique fortement toxique. D'ailleurs, j'insisterai surtout dans cette étude, sur la description des phénomènes qui accompagnent l'injection du foie à des animaux neufs.

L'étude des coupes a été faite sur des pièces fixées avec la solution saturée acide de bichlorure de mercure. J'ai employé, après bien des essais, le liquide colorant suivant, qui m'a permis de bien suivre les diverses transformations de la cellule hépatique au sein des macrophages :

Sol. a)	Eosine aqueuse............	0 gr. 25 centigrammes.
	Alcool à 40°................	100 grammes
Sol. b)	Solution saturée de methyl-orange dans l'alcool absolu.	

On mélange les solutions *a* et *b* en parties égales. Les coupes sont laissées en contact pendant 5 minutes avec ce mélange acide ; on décolore à fond avec l'alcool absolu, puis on colore pendant 10 minutes avec l'hématoxyline de Delafield. Les hématies se colorent alors en jaune-vert pâle ; le protoplasma des cellules hépatiques injectées est coloré en rose assez vif à l'extérieur des macrophages et pendant les premières heures qui suivent leur englobement ; il prend une coloration de plus en plus orangée, à mesure que progresse la digestion intracellulaire ; finalement, et lorsqu'il est sur le point de se dissoudre dans l'intérieur des vacuoles digestives, sa coloration est d'un orange très franc.

II

L'injection d'une émulsion de foie dans le péritoine du cobaye, qu'il s'agisse de foie de lapin ou de foie de grenouille, donne lieu à une série de phénomènes macroscopiques sensiblement analogues dans les deux cas. Dès les premières heures qui suivent l'injection, les fragments de foie se fixent et s'accumulent sur l'épiploon, le mésentère, surtout les mésentères gastro-splénique et gastro-hépatique ; ces surfaces prennent un aspect rouillé quand il s'agit du foie de lapin, noir dans le cas de la grenouille (le foie de cet animal étant très riche en pigment noir brun que le broiement de l'organe met en liberté dans l'émulsion). A mesure que le liquide péritonéal, brun au début, s'éclaircit, le dépôt épiploïque s'épaissit et se fonce davantage ;

en même temps il se concentre sur certains points de l'épiploon et disparaît graduellement sur d'autres, si bien que 4 jours environ après l'injection, l'exsudat péritonéal est entièrement clair; les surfaces mésentériques et épiploïques apparaissent nettes et brillantes sur presque toute leur étendue; au contraire, un épais dépôt de foie s'est accumulé, sous forme de bourrelet, le long du bord inférieur de l'épiploon, au niveau de la portion glandulaire de l'organe; çà et là, dans les replis de l'épiploon et du mésentère, on trouve également des grumeaux hépatiques dont la taille peut atteindre le volume d'un gros pois : mais ces grumeaux sont bien délimités, adhérents au substratum; le dépôt diffus a disparu. De petits amas, beaucoup plus rares, existent également à la face inférieure du diaphragme et en divers points de la paroi.

Ces grumeaux diminuent progressivement de volume et se résorbent. Nous avons déjà vu le dépôt diffus disparaître au bout de 3-4 jours; au bout de 10 jours les plus petits amas, ceux dont le volume ne dépasse pas celui d'une épingle, ont disparu également. Au bout de 2 mois il ne reste plus que des fragments fixés au bord glandulaire de l'épiploon, mais très réduits, très fragmentés et fortement adhérents au substratum. Il m'est arrivé d'en trouver encore au bout de 3 mois : ils sont alors à peine perceptibles à l'œil nu. Jamais je n'en ai observé au delà de 4 mois après l'injection : donc, à ce moment, la résorption du foie injecté dans le péritoine est complète.

La résorption graduelle du foie introduit dans l'organisme par la voie veineuse est impossible à suivre à l'œil nu : cette injection donne lieu à une hyperhémie intense du foie et de la rate; ce dernier organe en particulier double et triple parfois de volume; à la coupe le sang s'en échappe à flots. Dans le cas d'injections intraveineuses répétées, sa surface devient bosselée et montre de petits tubercules durs et l'organe tout entier prend une consistance fibreuse. De nombreux foyers de pneumonie lobulaire parsèment les poumons pendant les premiers jours qui suivent l'injection intraveineuse; des ecchymoses : sous-pleurales et sous-capsulaires apparaissent dans les poumons et les reins. Ces divers phénomènes conjestifs et échymotiques sont particulièrement intenses dans le cas où l'on injecte du foie de grenouille.

Très peu de temps après l'injection du foie dans le péritoine, on constate l'engorgement des lymphatiques de la paroi abdominale ainsi que de ceux qui se rendent aux ganglions mésentériques ; 3-8 jours après l'inoculation, les ganglions mésentériques prennent une teinte d'un brun violet qui disparaît graduellement au bout de quelques semaines. La rate, dans le cas où le foie injecté appartient à la grenouille, acquiert au bout d'une semaine une coloration franchement brune. Nous verrons plus loin que ces changements de coloration sont en rapport avec la rentrée, dans la rate et les ganglions, de nombreux macrophages chargés de pigment hépatique qu'ils ont englobé dans la cavité péritonéale. Il y a donc ici transport en divers points de l'organisme des produits absorbés dans le péritoine, phénomène qui n'existe pas lorsque l'on fait dans cette séreuse des injections de carmin, ainsi que l'a démontré Ricoux[1] dans sa thèse inaugurale.

Presque toujours quelques adhérences fibreuses finissent par réunir entre eux les replis de l'épiploon où se trouvent logés les grumeaux de foie. Il s'agit là, ainsi que nous le verrons plus loin, d'un développement de tissu conjonctif de nouvelle formation, qui s'organise autour de la masse hépatique, au sein de la coque fibreuse qui entoure cette dernière. Cette réaction fibreuse est d'autant plus énergique que l'animal est mieux vacciné ; elle est particulièrement intense dans les cas où on injecte du foie de grenouille. Souvent, dans ce dernier cas, et surtout lorsqu'il s'agit de grumeaux volumineux, la masse hépatique se trouve, vers le 3e mois, logé dans une épaisse coque fibreuse, alors que son centre n'est pas encore complètement résorbé.

L'injection de l'émulsion du foie donne lieu à un certain nombre d'effets toxiques s'accompagnant de lésions cellulaires du sang, du rein, du foie, du poumon, de la rate et d'autres organes ; ces lésions sont beaucoup plus profondes avec le foie de grenouille qu'avec celui de cobaye ou de lapin, et surtout lorsque l'injection a lieu dans les veines.

Sang. — L'injection de foie est toujours suivie d'un court stade d'hypoleucocytose, extrêmement marqué lorsque l'injec-

1. Ricoux, *Contribution à l'étude du problème de l'inflammation*, thèse de Paris, 1898.

tion se fait dans les veines. A ce moment, en effet, il se produit une accumulation énorme de polynucléaires dans les petits vaisseaux du poumon, dans les sinus de la rate, dans les capillaires du foie.

Vers la 6e heure apparaît une hyperleucocytose considérable, le nombre des polynucléaires atteignant à ce moment 75 ou 80 0/0 du nombre total des leucocytes en circulation. Au bout de 24 heures, on constate invariablement une destruction très énergique de globules rouges dans les sinus de la rate et des ganglions lymphatiques, ainsi que dans les capillaires du foie, destruction qui s'opère toujours au sein des macrophages. Ces derniers, particulièrement dans la rate, sont tellement bourrés d'hématies que l'organe présente souvent à ce moment l'aspect microscopique d'une rate malarique. Les globules ainsi détruits appartiennent bien à l'espèce animale ayant subi l'injection et non pas à l'espèce ayant fourni le foie, ainsi qu'il est facile de s'en rendre compte lors des injections faites avec du foie de grenouille. Dans les cas de cachexie toxique survenant après des injections répétées, on voit apparaître en grand nombre dans le sang des hématies nuclées. Ces cas coïncident avec une abondante formation de globules rouges nucléés dans la rate.

Rate. — Les modifications de la rate sont extrêmement intéressantes à observer dans les cas de cachexie toxique ; on y voit apparaître, en effet, avec une abondance variable, tous les éléments cellulaires caractéristiques de la moelle osseuse. Cette transformation myéloïde de la rate, que d'ailleurs je n'ai jamais vue totale, est faible après une seule injection de foie, très énergique, au contraire, chez les individus en cours de vaccination.

Voici les éléments anormaux que l'on trouve constamment et en grande abondance chez ces derniers : *a*) de grands éléments à noyau bourgeonnant (megacaryocytes) distribués par très petits groupes et relativement rares; *b*) des éléments éosinophiles en très grand nombre : les uns mononucléaires, à protoplasma assez peu développé, d'autres plus volumineux avec noyau en boudin, d'autres enfin à noyau identique à celui des polynucléaires du sang. Les granulations oésinophiles sont très petites et appartiennent au groupe des pseudo-éosinophiles de Ehrlich ; *c*) des éléments à protoplasma fortement baso-

phile et bourrés souvent de très petites granulations se colorant en violet par la thionine; ils sont mono ou polynucléaires; *d*) de nombreuses cellules mères des hématies, à protoplasma acidophile, à noyau très compact, se colorant en violet noir homogène par la thionine. Tous ces éléments nouveaux venus apparaissent dans les sinus de la pulpe; je ne les ai que très rarement observés dans les glomérules. Cette transformation myéloïde est précédée et accompagnée d'un très grand nombre de karyokinèses des petits éléments de la pulpe : ce fait conduit à penser que la transformation a lieu sur place et qu'il ne s'agit pas là, tout au moins d'une façon exclusive, d'éléments issus de la moelle osseuse et immigrés dans la rate. La moelle osseuse ne présente d'ailleurs, au cours de ces injections, aucune modification appréciable.

La transformation myéloïde de la rate est donc un fait facile à constater chez les animaux-traités par les injections répétées de foie; pour ce qui est de la description morphologique de ces éléments et de leur mode de groupement, je n'ai pu que confirmer les faits établis par Dominici[1] dans ses savants mémoires.

Dans les cas d'injections uniques, cette transformation est nulle ou à peine marquée; elle est en tout cas incomplète et l'on ne rencontre alors que certains des types cellulaires énumérés plus haut; ce sont les megacaryocytes qui m'ont semblé apparaître les premiers; puis viennent les myélocytes éosinophiles. La transformation paraît s'arrêter à ce stade.

Chez les animaux ayant subi des injections intraveineuses multiples, on constate dans la pulpe des îlots nombreux de tissu fibreux qui présentent, dans une gangue fibreuse, des cellules géantes encore bourrées de pigment hépatique, nés de la confluence des gigantophagocytes pulpaires et rattachés par de nombreuses brides conjonctives du tissu fibreux environnant.

Rein. — Les injections intraveineuses de foie de cobaye ne déterminent que des phénomènes de légère irritation passagère. L'hyperhémie capillaire est faible; la plupart des cellules des tubuli ont leur protoplasma creusé d'une énorme vacuole refoulant le noyau contre la paroi et témoignant d'une suractivité sécrétoire. Au bout de 24 heures tout est terminé; quelques

1. Dominici, *Arch. méd. expér.*, novembre 1900, p. 744, et janvier 1901, p. 1.

lambeaux de protoplasma sont tombés dans la lumière du tube. Il n'y a pas d'infiltration leucocytaire.

Les injections de foie de grenouille donnent lieu, au contraire, à de sérieux phénomènes de néphrite aiguë : 48 heures après l'injection, on observe souvent une altération profonde des cellules des tubuli ; certains tubes sont complètement dépouillés de leur épithélium : protoplasme et noyaux forment un magma réuni au centre de la lumière ; ailleurs l'épithélium adhère encore par lambeaux, ou bien on constate un gonflement énorme des cellules épithéliales.

Les espaces lymphatiques intertubulaires sont infiltrés de nombreux mononucléaires à noyau fortement chromatique ; bon nombre de ces éléments ont pénétré dans l'intérieur des tubes contournés, Les tubes collecteurs contiennent de gros cylindres urinaires, mais leurs cellules propres sont en bon état. Les capillaires sont partout gorgés de sang. Ces formes de néphrite aiguë sont d'ailleurs suivies de la mort rapide de l'animal.

Foie. — La cellule hépatique ne semble pas souffrir de l'injection de foie de cobaye. Le seul phénomène appréciable est l'apparition dans le protoplasme cellulaire, 24-36 heures après l'injection, de grains ovoïdes se colorant en jaune orange par le méthyl-orange, en vert par la thionine ; leurs réactions colorantes sont sensiblement les mêmes que celles des hématies digérées dans l'intérieur des macrophages. Il s'agit là évidemment d'un produit d'élaboration de la cellule hépatique ; il est aisé de se rendre compte que ces grains apparaissent sous forme de petits microsomes qui se multiplient par division : on les trouve en effet le plus souvent accolés deux par deux et souvent rattachés l'un à l'autre par un pont transversal (formes en haltères).

Les injections de foie de grenouille sont au contraire toxiques pour la cellule hépatique ; bon nombre de ces éléments, en effet, bien que l'aspect de leur protoplasma paraisse normal, sont entourés de leucocytes mononucléaires à gros noyau qui fréquemment pénètrent dans l'intérieur même de la cellule attaquée.

Poumon. — 24-48 heures après l'injection intraveineuse de foie, on trouve dans le poumon des lésions de pneumonie lobulaire disséminées en foyers. A ce niveau les alvéoles contiennent de nombreuses hématies au milieu desquelles pénètrent des macrophages qui les englobent en masse.

L'épithélium alvéolaire n'est que rarement altéré. Des phénomènes analogues s'observent au milieu des bronches lobulaires. D'ailleurs ce processus pneumonique s'éteint rapidement et sans laisser de traces ; les exsudats se résorbent et au bout de 10 jours l'aspect microscopique du poumon est normal.

III

Telles sont les principales lésions anatomo-pathologiques dues à l'action des poisons hépatiques. Nous allons maintenant étudier le sort des cellules hépatiques elles-mêmes injectées dans le péritoine ou dans les veines.

Résorption des cellules hépatiques en suspension dans l'exsudat péritonéal. — Jusque vers la fin du 3e jour après l'injection, on trouve dans l'exsudat des cellules hépatiques libres, en nombre, il est vrai, de moins en moins grand. Ces éléments, dont le protoplasme est plus ou moins déchiqueté, présentent un noyau intact et vivant. Si, en effet, nous faisons avec l'exsudat de 48 heures une goutte suspendue à laquelle nous ajoutons une trace de solution aqueuse de bleu de méthylène, nous y observerons une masse de gros leucocytes mononucléaires gorgés de débris de cellules hépatiques; les noyaux de ces dernières s'y colorent en violet pâle ; les noyaux des cellules libres ne prennent au contraire aucune coloration. En outre, et dans le cas d'injections de foie de lapin seulement, ces mêmes macrophages contiennent en abondance de gros microsomes colorés en vert pâle par le bleu. Ces microsomes ne s'observent pas dans les cellules hépatiques libres, ou du moins ils n'y présentent pas les mêmes réactions colorantes; il s'agit donc là de certaines portions du protoplasme hépatique ayant subi de la part des macrophages une élaboration spéciale.

Dès les premières heures qui suivent l'injection, le péritoine est envahi par une masse énorme de leucocytes ; polynucléaires et gros mononucléaires s'y trouvent en nombre à peu près égal.

Les polynucléaires aussi bien que les macrophages englobent aussitôt des fragments de cellules hépatiques. Les polynucléaires se gorgent d'une substance granuleuse, empruntée à la cellule hépatique, qui refoule le noyau et se colore bientôt, au sein du

protoplasma leucocytaire, en vert par la thionine. Ce métachromatisme est absolument caractéristique. Au bout de 24 heures la masse intracellulaire devient acidophile, se colore en rose vif par l'éosine, tandis qu'une foule de fines granulations éosinophiles apparaissent tout autour dans le protoplasma du leucocyte. Jamais ces polynucléaires n'englobent de noyaux hépatiques.

Les mononucléaires englobent également dès le début des portions de cellules hépatiques, non plus sous forme d'un amas granuleux et mal délimité, mais bien sous forme de fragments protoplasmiques à bords nets et très fréquemment munis de leur noyau. Ces fragments se trouvent inclus dans de grandes vacuoles où la thionine les colore en vert; ils y deviennent de moins en moins distincts, mais sans jamais subir la transformation éosinophile. Quant aux microsomes dont nous avons parlé plus haut, ils ne se rencontrent pas dans les polynucléaires. Dans les mononucléaires, ils s'accumulent de préférence autour du noyau. Il est difficile d'affirmer si ces microsomes sont l'homologue du pigment hépatique noir si abondant dans le foie de la grenouille. Lorsque l'on injecte du foie de grenouille dans le péritoine d'un cobaye, on trouve d'abord ces grains de pigment librement suspendus dans l'exsudat péritonéal qui à ce moment rappelle une solution d'encre de Chine. Les polynucléaires et les mononucléaires englobent des quantités considérables de ce pigment, mais les mononucléaires s'en gorgent avec une voracité toute particulière. Le macrophage apparaît alors comme une tache d'un noir d'encre; il faut souvent quelque peine pour retrouver le noyau refoulé à la périphérie, et noyé au milieu de ce pigment hépatique. La présence de ce pigment à l'intérieur des macrophages les signale immédiatement à notre attention, et nous permet de les suivre ensuite dans toutes leurs migrations à travers la séreuse péritonéale et jusque dans l'intérieur des organes lymphoïdes. Ce pigment est digéré au sein de petites vacuoles bien délimitées. La digestion est d'autant plus rapide que l'animal est mieux vacciné.

Au bout de 3 jours, l'exsudat péritonéal ne contient plus ni cellules hépatiques ni pigment libre; on y rencontre encore quelques macrophages contenant des débris de cellules ainsi que des polynucléaires englobés. L'exsudat est clair au bout de 4 jours; on y trouve à partir de ce moment une foule de gros

lymphocytes (ou petits mononucléaires), à noyau très chromatique, à protoplasma franchement basophile, et dont nous aurons l'occasion de parler plus loin à propos de la néo-formation du tissu fibreux.

Quand on injecte dans le péritoine des cobayes non plus du foie de lapin, mais du foie de cobaye, on observe que la mononucléose l'emporte cette fois dès le début de beaucoup sur la polynucléose; on rencontre en général un polynucléaire pour 5 mononucléaires. De plus, les polynucléaires présents ne phagocytent pas; leur protoplasma reste clair. Les macrophages englobent au contraire rapidement les cellules hépatiques injectées et les digèrent dans de grandes vacuoles. Jamais, néanmoins, ces fragments ingérés ne présentent, après coloration par la thionine, le métachromatisme vert signalé plus haut.

Tandis qu'un certain nombre de cellules injectées se détruisent ainsi dans l'exsudat à l'intérieur des phagocytes, le phénomène principal se passe à la surface de l'épiploon et s'y continue alors que l'exsudat péritonéal est déjà clarifié. C'est là que, par la méthode des coupes, nous allons pouvoir l'étudier dans tous ses détails.

IV

RÉSORPTION DES GRUMEAUX HÉPATIQUES ACCOLÉS AU BORD INFÉRIEUR DE L'ÉPIPLOON

a) Étude d'un grumeau hépatique 24 *heures après l'injection.* — Étudions, par la méthode des coupes, un grumeau de taille moyenne, par exemple, du volume d'un grain de blé, 24 heures après l'injection du foie de lapin ou de grenouille dans le péritoine d'un cobaye. A un examen d'ensemble, nous voyons ceci : au centre se trouve une masse de cellules hépatiques, bien reconnaissables, accolées les unes aux autres, tout en conservant leur individualité; leurs noyaux se colorent bien, seulement la chromatine, au lieu de se présenter comme dans le foie en place sous forme de 1 ou 2 gros grains centraux, avec couronne périphérique de très petits grains, est ici réduite en une sorte de poussière de grains chromatiques diffusés dans la masse entière du noyau. Cette zone centrale, qui représente environ le 1/5 de l'épaisseur totale du noyau, n'est pas infiltrée

de leucocytes. Çà et là un noyau leucocytaire, appartenant exclusivement à des leucocytes polynucléaires.

Autour de cette zone centrale se trouve une bande, brusquement délimitée vers le centre, moins bien définie vers la périphérie, où nous voyons la masse hépatique infiltrée d'un nombre colossal de leucocytes ; les polynucléaires prédominent dans la portion centrale ; du côté périphérique, les gros mononucléaires apparaissent presque exclusivement. A ce niveau, les noyaux de cellules hépatiques ne se colorent plus que rarement; dans ce cas même, la chromatine a disparu et le noyau apparaît comme une pâle tache lilas. Vers la périphérie de cette zone d'infiltration, beaucoup de noyaux se colorent en rose par l'éosine. Cette zone moyenne occupe de chaque côté 1/5 environ de l'épaisseur totale du grumeau.

A la périphérie du grumeau, nous trouvons une zone où l'infiltration leucocytaire est, à première vue, moins abondante; on y voit moins de noyaux de leucocytes : c'est qu'ici, en effet, les polynucléaires manquent presque totalement. Le tissu hépatique, vu à un faible grossissement, y apparaît comme divisé en segments irréguliers de forme et de dimensions, mais nettement séparés les uns des autres. A ces segments sont accolés des noyaux de mononucléaires; on a là un tableau qui rappelle l'aspect des *Körnchen Kugeln*. Les noyaux des cellules hépatiques ne sont plus visibles en général; là où on les trouve encore, ils apparaissent comme une tache ovoïde et nettement éosinophile. Cette bande périphérique se creuse de lacunes nombreuses remplies de leucocytes mononucléaires.

L'amas tout entier est entouré d'une coque fibrineuse peu épaisse qui l'isole de l'épiploon. On y trouve quelques leucocytes polynucléaires et un nombre un peu plus considérable d'éléments mononucléaires, à noyau volumineux et très chromophile, à protoplasma basophile. Nous verrons plus loin le rôle de ces éléments.

L'endothélium péritonéal est en bon état. Immédiatement sous l'endothélium, il y a une accumulation considérable de leucocytes mononucléaires, grands et petits, le protoplasma vide d'inclusions et sortant des fentes lymphatiques sous-endothéliales. Partout ils traversent l'endothélium et pénètrent dans la coque fibrineuse qui entoure le grumeau.

Nulle part, dans le tissu conjonctif sous-endothélial, je n'ai pu trouver de karyokinèses. Il est hors de doute que ces éléments mobiles ne sont pas nés sur place, mais viennent de plus loin, en suivant la voie lymphatique. Ils sont identiques, morphologiquement, avec les leucocytes mononucléaires à gros noyau vésiculeux, de la pulpe splénique ou des lacunes ganglionnaires. D'ailleurs, sur des coupes de rate du même animal, on voit la capsule infiltrée en tous sens par une foule d'éléments semblables, qui pénètrent directement dans la cavité péritonéale à travers l'endothélium splénique. J'ajoute que cet endothélium est fortement turgescent; il fait une saillie prononcée dans la cavité, mais il semble demeurer en place.

Analysons de plus près ces divers tableaux microscopiques. Nous voyons donc que notre grumeau présente : une zone centrale non attaquée où les cellules hépatiques sont intactes; une zone moyenne, abondamment infiltrée de leucocytes avec prédominance des polynucléaires dans la portion centrale; une zone périphérique où le magma hépatique est complètement disloqué, on n'y trouve que des leucocytes mononucléaires.

La zone périphérique est entièrement infiltrée et disloquée par des mononucléaires et des mononucléaires seulement. Les uns s'étalent à la surface du grumeau; d'autres s'insinuent comme des coins dans les interstices cellulaires : ceux-là sont très allongés, le noyau occupant l'extrémité postérieure, leur direction générale est radiaire par rapport à la coupe du grumeau. Chemin faisant, même lorsqu'ils ne contiennent aucun fragment de protoplasma hépatique, ils se chargent de grains vert bleu, qui permettent de délimiter exactement leur masse protoplasmique; un grand nombre, très étirés, pénètrent dans l'intérieur des cellules hépatiques et les disloquent; d'autres enfin, et ce sont les plus nombreux à ce niveau, s'étalent à la surface des fragments hépatiques disloqués et les englobent complètement. Dans ce cas le noyau est refoulé à la périphérie; les microsomes verts sont accumulés entre le noyau et le fragment hépatique employé; quant à ce dernier, il remplit la presque totalité du phagocyte. Ce sont les fragments hépatiques enfermés dans les macrophages qui donnent au grumeau l'aspect segmenté qui nous avait frappé tout d'abord. Dans cette zone périphérique on ne trouve plus de cellules de foie libres;

toutes sont englobées. Les noyaux hépatiques sont invisibles, ou se colorent en rose par l'éosine : ils semblent donc subir l'action des ferments digestifs plus rapidement que le protoplasma lui-même.

Souvent, et surtout dans la zone la plus externe, on trouve des cellules géantes formées par la confluence des macrophages. Tous les noyaux sont rejetés vers la périphérie et de ce côté les cellules sont encore distinctes les unes des autres ; au contraire, les extrémités des corps allongés dans le sens de la progression se confondent si bien que la cellule géante affecte la forme d'un éventail. La digestion intracellulaire semble plus avancée à l'intérieur de ces plasmodes ; les fragments de cellules hépatiques y sont enfermés dans de grandes vacuoles ; quelques-uns sont presque dissous, ne prennent plus que faiblement la couleur acide. Les microsomes verts y sont constamment situés autour du noyau leucocytaire.

Si, de là, nous nous reportons vers une région plus centrale du grumeau, là où les polynucléaires ont pénétré en grand nombre, nous voyons que de ces polynucléaires les uns encombrent les lacunes interstitielles du magma hépatique ; leur protoplasme y est bourré de cette substance granuleuse déjà observée dans l'exsudat ; ces inclusions sont enfermées dans des vacuoles et y ont une réaction franchement éosinophile. Un très grand nombre de polynucléaires ont pénétré dans l'intérieur des cellules hépatiques ; là, les noyaux leucocytaires prennent les formes les plus étranges : les uns s'épanouissent en bouquets de filaments, chaque filament se terminant par un gros bouton chromatique, offrant ainsi l'aspect d'une gerbe en éventail ; d'autres affectent la forme de grappes allongées dont les éléments s'insèrent le long d'un filament central. On y retrouve toutes les formes décrites et figurées par Guarnieri [1] dans son mémoire sur la pustule vaccinale, et que Salmon [2] a considérées, à juste titre, comme des leucocytes immigrés. Il est hors de doute, après cela, que les polynucléaires se chargent de certains éléments du protoplasma hépatique. Jamais ils ne contiennent de noyaux hépatiques ou de grains verts.

Un grand nombre de ces polynucléaires dégénèrent dans

1. GUARNIERI, *Archive per le scienze mediche*, 1892.
2. SALMON, *Annales Inst. Pasteur*, 1897, t. XI, p. 288.

les lacunes interstitielles de cette région. Leur noyau est souvent en chromatolyse, réduit en une infinité de petits grains chromatiques; souvent aussi le noyau présente cet aspect vacuolaire propre aux polynucléaires des exsudats tuberculeux. Ils semblent tués par quelque substance toxique qu'ils absorbent avec le protoplasma hépatique.

Cette zone moyenne est également infiltrée de mononucléaires; un grand nombre contiennent des fragments hépatiques; bon nombre de cellules hépatiques sont, néanmoins, encore libres. Un très grand nombre de macrophages y avalent des polynucléaires chargés de débris.

La description précédente s'applique à la résorption du foie de lapin injecté dans le péritoine des cobayes. Les phénomènes qui accompagnent la résorption du foie de grenouille sont sensiblement les mêmes. Ici seulement le pigment noir accumulé dans les macrophages est infiniment plus abondant; de plus, les polynucléaires de la région centrale du grumeau contiennent, eux aussi, du pigment noir, bien que en quantité beaucoup moins grande que les leucocytes mononucléaires.

Comment expliquer cette polynucléose abondante du centre de l'amas alors que les polynucléaires font défaut dans la portion périphérique? Il est vraisemblable que dès les premiers moments de l'accumulation des cellules hépatiques sur l'épiploon, les polynucléaires à ce moment présents dans la cavité péritonéale y ont pénétré en grand nombre. Puis, de nouveaux polynucléaires ne pénétrant plus dans la cavité (sans doute en vertu du faible pouvoir chimiotactique du foie sur ces éléments) et de nouvelles couches de cellules hépatiques venant s'agglomérer au-dessus des couches primitives, l'infiltration leucocytaire n'a plus été due qu'aux seuls mononucléaires sortant en grand nombre des organes lymphoïdes.

A cette période, sur une coupe de la rate, on trouve un nombre assez considérable de mononucléaires chargés de pigment noir dans la portion sous-capsulaire de la pulpe; on n'en trouve guère dans les grands sinus sanguins. Ce fait semble indiquer que la rentrée de ces éléments dans la rate s'effectue en passant directement de la cavité péritonéale à travers l'endothélium splénique. Ces éléments se retrouvent également, mais beaucoup plus rarement, dans les ganglions mésentéri-

ques; enfin, les cellules de Kupfer du foie ne contiennent aucune trace de pigment.

Tels sont les phénomènes que l'on observe dans la masse des grumeaux hépatiques.

Au niveau de la coque fibrineuse qui entoure le grumeau, on peut déjà observer la formation de quelques fibres conjonctives. Le mécanisme en est intéressant à signaler.

Ces jeunes fibres conjonctives sont courtes, épaisses, très ondulées. Elles se présentent sous l'aspect de longs boudins flexueux montrant une portion axiale qui occupe presque toute l'épaisseur de la fibre, ne se colorant pas par l'éosine, brillante, fendillée dans le sens de la longueur de façon à figurer un écheveau compact. Cette portion centrale est enveloppée d'un mince manchon, se colorant en rose par l'éosine, présentant des épaississements au niveau des noyaux de la fibre. Ce manchon lui-même montre une fine structure fibrillaire. Sur cette gaine sont appliqués les noyaux, très allongés, de la jeune fibre conjonctive, les uns volumineux, pâles, riches en suc nucléaire; les autres d'une extrême petitesse, très minces, et fortement chromatiques.

Ces fibres se forment de la façon suivante : la coque fibrineuse est abordée de l'extérieur, par des éléments mononucléaires, à noyau volumineux, présentant au centre un ou deux gros grains de chromatine et un réseau de chromatine périphérique. Leur protoplasma, assez volumineux, est homogène et basophile. En somme, ces éléments rappellent les formes jeunes des mononucléaires macrophages. Ils s'étalent à la surface du filament de fibrine; leur noyau s'y applique intimement. Leur protoplasma s'étale de plus en plus, engainant ainsi un filament de fibrine qu'il encapuchonne aux deux extrémités; souvent plusieurs cellules s'étalent à la surface du même filament autour duquel ils forment un plasmodium allongé; le filament de fibrine se trouve de la sorte rapidement inclus dans ce plasmodium ou dans cette cellule unique, et isolé du reste du réseau fibrineux.

Au sein de ce plasmodium la portion centrale de la fibrine perd rapidement son affinité pour l'éosine; elle reste incolore, se fendille dans le sens de la longueur, constituant ainsi un écheveau de fibrilles. Il s'agit là évidemment d'une élaboration

de la fibrine due aux ferments digestifs du plasmodium. La gaine périphérique conserve sa colorabilité et représente pour ainsi dire l'exoplasme cellulaire. Ses noyaux étalés à la surface perdent rapidement leur caractère primitif; ils semblent grossir d'abord, se gorger de sucs nucléaires, puis ils s'allongent, diminuent, « maigrissent » et, dans la fibre constituée, ont acquis un volume très petit par perte du suc nucléaire.

La fibre toute entière s'allonge, s'amincit, s'étrangle même de place en place. Tel est le mode d'apparition des jeunes fibres conjonctives dans les cas observés par moi ; la substance fibrillaire est le résultat d'une élaboration protoplasmique nettement en rapport avec le pouvoir phagocytaire. Quant à l'origine des éléments qui ont servi à la formation de la fibre, il n'est pas douteux pour moi qu'il ne s'agisse là de leucocytes et de stades jeunes de macrophages. Ce sont des éléments migrateurs et, de plus, des phagocytes; à ce point de vue mes observations sont complètement d'accord avec celles de F. Marchand[1]; mais tandis que ce savant considère ces « fibroblastes » comme des cellules du tissu conjonctif mobilisées, en s'appuyant sur le nombre considérable de karyokinèses qui s'observaient à ce moment dans le tissu conjonctif de la région, je crois pouvoir affirmer que, du moins dans le cas présent, ces éléments ont une origine tout autre. En effet, non seulement je n'ai observé à ce moment aucune karyokinèse dans le tissu conjonctif de l'épiploon, mais j'ai vu ces mêmes éléments se montrer en grand nombre dans les espaces lymphatiques sous-endothéliaux, mélangés aux macrophages en diapédèse. De plus, ils sont identiques aux formes jeunes de ces mêmes macrophages que l'on observe dans la pulpe de rate. D'ailleurs, nous verrons plus loin que les macrophages adultes, même associés en cellules géantes, peuvent devenir à un moment donné cellules fixes du tissu conjonctif;

b) *Étude d'un grumeau hépatique 3 jours après l'injection intra-péritonéale.* — Ici nous trouvons la portion centrale du grumeau complètement infiltrée et disloquée par les mononucléaires. On y trouve encore, néanmoins, bon nombre de cellules hépatiques non englobées dont les noyaux se colorent faiblement par les couleurs basiques. Dans les grumeaux de foie de grenouille, les

1. F. Marchand, *Der Process der Wundheilung*, Stuttgard, 1901, p. 116.

noyaux de la région centrale ne prennent plus la couleur. Ils sont visiblement atteints de nécrose.

La zone moyenne, à polynucléaires, est entièrement envahie par les mononucléaires ; la masse hépatique y présente cet aspect segmenté que nous avions observé, dans le cas précédent, à la partie périphérique du grumeau. C'est qu'ici, en effet, presque toutes les cellules du foie se trouvent enfermées à l'intérieur des macrophages qui, en bien des endroits, se fusionnent et forment des cellules géantes bourrées de débris hépatiques. On ne trouve plus guère, dans les grumeaux de foie de lapin, de polynucléaires libres. Presque tous sont enfermés à l'intérieur des macrophages. Cette destruction des polynucléaires peut s'observer dans tous ses détails à l'intérieur de vastes lacunes qui, maintenant, existent en grand nombre dans la région moyenne du grumeau. Cette même destruction des polynucléaires est beaucoup moins avancée dans le foie de grenouille ; on y trouve encore un nombre considérable de ces microphages libres, le noyau refoulé à la périphérie, et contenant dans des vacuoles de larges fragments de protoplasma hépatique.

En somme, comme on le voit, la destruction de l'amas hépatique par les macrophages est beaucoup plus avancée que dans le cas précédent.

La région la plus intéressante à considérer dans le cas qui nous occupe est la zone périphérique du grumeau. Elle est entièrement occupée par de grandes cellules géantes à l'intérieur desquelles la digestion des fragments hépatiques est très avancée et souvent presque terminée. Ces plasmodia commencent par avoir leurs noyaux situés à la périphérie, les fragments de protoplasma hépatique enfermés dans de grandes vacuoles, occupant le centre de la formation. Autour du noyau sont accumulés les microsomes verts signalés plus haut. Ce sont les fragments de foie les plus voisins du noyau qui sont digérés les premiers; on peut suivre facilement leur dissolution à l'intérieur des vacuoles; ils prennent les couleurs acides avec de moins en moins d'énergie; finalement la vacuole reste pleine d'un liquide incolore. A mesure que s'opère cette dissolution, les noyaux tendent à avancer de plus en plus vers le centre du plasmodium et à se mettre en contact avec des portions de protoplasma hépatique dont la digestion est moins avancée ; si bien

que, là où la digestion intracellulaire est presque complète, les noyaux tendent à se réunir au centre de la cellule géante dont la périphérie est maintenant occupée entièrement par d'immenses vacuoles claires, séparées les unes des autres par de minces brides protoplasmiques. Le groupe central de noyaux entraîne, en se déplaçant, les grains de pigment vert disposés autour d'eux.

Les mêmes phénomènes s'observent dans les macrophages isolés, non fusionnés en plasmodia : le noyau avance à l'intérieur de la cellule à mesure que se poursuit la digestion intracellulaire du foie; il se trouve ainsi transporté bientôt d'une extrémité à l'autre de l'élément, sa position primitive étant maintenant occupée par les grandes vacuoles qui contiennent les résidus de la digestion intracellulaire.

Cette portion vacuolaire de la cellule géante ne tarde pas à se détruire; les bords du plasmodium s'effacent, se confondent avec le milieu ambiant: on voit se former autour de la cellule comme une atmosphère nuageuse, parsemée de fins granules légèrement colorée en rose par l'éosine. Le plasmodium « fond » par sa périphérie, il entre en phagolyse. La conséquence de ce fait est que les produits élaborés à leur intérieur sont mis en liberté dans le milieu ambiant. Ce phénomène que j'ai observé aussi bien dans la rate, après les injections intraveineuses de foie, que dans les grumeaux, fixés sur l'épiploon jusqu'au moment de leur complète résorption, me semble être absolument constant. Il est donc possible que tel est le mécanisme suivant lequel la substance sensibilisatrice est sécrétée dans les humeurs de l'animal.

Parmi ces macrophages en phagolyse, un grand nombre ont perdu, par suite de leur fonte, presque tout leur protoplasma; ils restent réduits au noyau, entouré de grains de pigment, et à unemasse protoplasmique relativement faible. C'est sous cette forme qu'on les voit rentrer en masse dans la circulation lymphatique et dans les organes lymphoïdes; les lymphatiques sous-endothéliaux du péritoine, la pulpe splénique, surtout la région sous-capsulaire, sont remplis à ce moment de macrophages bourrés de pigment hépatique. On en trouve également en notable quantité à l'intérieur des lacunes des ganglions mésentériques.

Au contraire, ces éléments ne semblent pas rentrer dans la moelle osseuse qui paraît ne prendre aucune part à ces phénomènes de résorption.

Un grumeau de taille moyenne met de la sorte 10 jours à 1 mois pour se détruire complètement. Le mécanisme est toujours le même que celui étudié jusqu'ici. Les mononucléaires gagnent de plus en plus le centre de l'amas. Toutes les cellules hépatiques sont successivement englobées, digérées à l'intérieur de ces éléments; ceux de la périphérie subissent la fonte phagolytique, puis rentrent dans la circulation lymphatique. C'est ainsi que vers le 15e jour on voit souvent des grumeaux réduits à 1 ou 2 cellules géantes.

La production de fibres conjonctives jeunes est peu abondante; tout se réduit à la formation de quelques fibres qui, développées, comme nous l'avons vu, dans la coque fibrineuse, établissent quelques adhérences entre les replis épiploïques où se trouvait logé le grumeau hépatique. Nous allons voir que cette néo-formation fibreuse est beaucoup plus énergique chez les animaux qui ont déjà subi plusieurs injections antérieures de foie, et tout particulièrement lorsque le foie injecté est celui de grenouille.

Avant de terminer ce paragraphe, disons quelques mots de la résorption du foie de cobaye injecté dans le péritoine du cobaye même. Cette résorption est plus rapide que dans le cas où l'animal qui fournit le foie et celui qui subit l'injection appartiennent à des espèces différentes. Un grumeau de faibles dimensions est, 24 heures après l'injection, complètement infiltré jusqu'en son centre. Les polynucléaires ne prennent ici aucune part à l'attaque des cellules hépatiques; les mononucléaires seuls sont attirés. Jamais, en outre, on n'assiste aux phénomènes de fonte cellulaire et de phagolyse que nous avons observés plus haut;

c) Résorption du foie de grenouille dans le péritoine d'un cobaye ayant subi des injections répétées. — Étude d'un grumeau de 5 jours. — Le fait le plus remarquable dans ce cas, c'est l'énergie de la réaction fibreuse et la participation des cellules géantes, bourrées de fragments hépatiques, à la constitution du tissu fibreux.

La coupe d'un semblable grumeau nous montre : au centre, une masse peu volumineuse de cellules hépatiques non infiltrées,

ayant subi un commencement de nécrose, les noyaux étant devenus complètement invisibles.

Autour de cette masse centrale, une couronne *unique* de cellules géantes, disloquant l'amas hépatique, bourrées de fragments à divers stades de digestion intracellulaire, parsemées à la périphérie de grandes vacuoles et subissant déjà à ce niveau la fonte phagolytique. La portion périphérique de ces cellules géantes envoie dans tous les sens de longs prolongements dans lesquels le protoplasma présente un aspect fibrillaire. Ces prolongements se ramifient, s'anastomosent entre eux, entourant ainsi la cellule géante d'un réseau de mailles assez larges. Le long de ces mailles s'étalent de nombreux éléments migrateurs à gros noyaux chromatiques, à protoplasma basophile, en tout semblables aux cellules que nous avons vues, plus haut, contribuer à la formation de la fibre conjonctive. Ces « fibroblastes » s'allongent, s'étirent en longs filaments qui s'accolent aux prolongements des cellules géantes.

En dehors de cette zone on trouve un amas de fibroblastes analogues, mais très étirés, émettant de toutes parts des prolongements qui s'anastomosent entre eux, constituant ainsi un tissu conjonctif à mailles très lâches, à corps cellulaires très volumineux et à noyaux présentant encore tous les caractères de ceux des leucocytes mononucléaires. Çà et là, au milieu du réseau, se voient de grandes cellules géantes, à couronne périphérique de noyaux, bourrées de pigment hépatique, mais ne contenant généralement plus de fragments cellulaires. Elles émettent, de toutes parts, des prolongements ramifiés, qui s'anastomosent avec le tissu conjonctif qui les entoure. Plus on approche de la périphérie du grumeau, plus on voit les fibroblastes s'allonger, prendre une structure fibrillaire et rubannée; de plus, ils s'orientent parallèlement les uns aux autres et concentriquement par rapport au centre de l'amas.

Au milieu de cette gangue fibreuse sont plongés de nombreux macrophages isolés ou réunis en cellules géantes, et rattachés au tissu fibreux par de nombreux prolongements ramifiés. Sa masse fibreuse se continue directement avec le réseau conjonctif de l'épiploon dont l'endothélium a disparu en ce point.

Il est évident que l'amas conjonctif tout entier a une double origine, étant constitué par une masse de fibroblastes anastomosés

entre eux d'une part, et de l'autre par de nombreuses cellules géantes, témoins d'un processus phagocytaire déjà terminé et devenues cellules fixes de ce tissu conjonctif de nouvelle formation.

Quelle est maintenant l'origine de ces fibroblastes ou plutôt de ces petits mononucléaires à noyau chromatique? Dans tout le tissu conjonctif environnant, on ne voit *aucune karyokinèse;* par contre, les vaisseaux lymphatiques de l'épiploon, et cela surtout en certains points déterminés, sont remplis de mononucléaires analogues à ceux qui donnent les fibroblastes. On les voit se diriger, par traînées, vers l'amas fibreux, traverser celui-ci et confluer en masse vers la couronne de cellules géantes en train de dévorer le reliquat hépatique. Le sens de la progression de ces cellules est nettement indiqué par le sens de leur allongement.

Sans pouvoir affirmer que le tissu conjonctif préexistant ne joue aucun rôle dans la constitution du tissu conjonctif jeune, je me suis convaincu néanmoins que tout au moins la plus grande partie de ce tissu nouveau se forme par la fixation de leucocytes mononucléaires jeunes, issus, par migration, de l'appareil lymphatique. Quant à la fixation des cellules géantes qui ont achevé leur rôle phagocytaire, elle ne peut être mise en doute un instant.

On trouve dans l'épiploon de nombreux macrophages chargés de pigment qui de toutes parts pénètrent dans les fentes lymphatiques. En certains points du rebord glandulaire de l'épiploon, ils sont accumulés au point d'y simuler de véritables amas ganglionnaires.

Bon nombre de cellules fixes du tissu conjonctif mésentérique sont bourrées de pigment noir, sans qu'il soit possible de dire s'il s'agit là de macrophages fixés nouvellement ou de cellules fixes ayant joué un rôle phagocytaire.

Toute la pulpe de la rate ainsi que les lacunes des ganglions mésentériques contiennent un grand nombre de ces macrophages chargés de granulations hépatiques.

Signalons encore ce fait, en terminant, que chez les animaux ayant subi des injections répétées, les polynucléaires ne jouent aucun rôle dans la destruction du foie injecté.

V

RÉSORPTION DES CELLULES HÉPATIQUES INTRODUITES DANS L'ORGANISME PAR VOIE INTRAVEINEUSE

Le foie de cobaye ou de grenouille que l'on injecte à un lapin par voie intraveineuse subit une destruction plus rapide que celui introduit dans l'organisme par voie intrapéritonéale.

Dans la rate, qui est le lieu principal de destruction du foie, je n'ai guère retrouvé de fragments appréciables de protoplasma hépatique plus d'une semaine après l'injection. Par contre, la destruction des polynucléaires, très énergique dès le début dans la pulpe de rate, se continue souvent pendant 15 jours ou 3 semaines.

Les trois barrières d'arrêt du foie injecté sont, au début, le poumon, le foie, la rate. Le rôle du poumon est vite terminé; au bout de 36 heures on n'y trouve plus de fragments hépatiques. Celui du foie dure plus longtemps; mais c'est dans la rate, à l'intérieur des sinus sanguins, que s'opère la presque totalité de la destruction. Quant aux ganglions mésentériques, leur rôle est tardif et, en somme, peu important; ce n'est que vers le 3e jour que l'on voit apparaître quelques macrophages chargés de granulations hépatiques.

Poumon. — 4 heures après l'injection intraveineuse on trouve des fragments hépatiques, avec noyaux bien conservés, arrêtés dans les vaisseaux de petit calibre. Ces fragments sont infiltrés de leucocytes polynucléaires qui contiennent déjà des débris de protoplasma hépatique. On n'y voit pas de mononucléaires.

Au bout de 12 heures, ces mêmes amas sont entourés, pénétrés en tous sens par les mononucléaires qui ont déjà réduit le fragment tout entier à l'état de *körnchenkugeln.* Ces macrophages, en même temps que les cellules du foie, englobent les polynucléaires qui y ont pénétré. Ces mononucléaires remplissent les vaisseaux lymphatiques et pénètrent dans les vaisseaux par diapédèse à travers l'endothélium. Celui-ci reste en place, intact.

Au bout de 24 heures, on ne trouve plus que de rares macrophages gorgés de fragments hépatiques. Il est évident que la majorité d'entre eux, entraînés par le courant sanguin, a dû venir échouer dans la rate ou le foie, car l'on n'en retrouve pas ailleurs.

Foie. — Dès 4 heures après l'injection, les cellules de Kupfer démesurément gonflées et étalées sont remplies de petits fragments hépatiques se colorant en rose par l'éosine. Quand l'injection a été faite avec du foie de grenouille, elles sont tellement bourrées de pigment noir que l'on a souvent une peine infinie à trouver le noyau. Ce pigment hépatique, qui semble se détruire plus lentement que le protoplasma hépatique lui-même, se retrouve encore dans les cellules de Kupfer au bout de 10 jours, mais beaucoup moins abondant et moins foncé.

Rate. — C'est ici le foyer principal pour la destruction des cellules hépatiques. Quatre heures après l'injection intraveineuse, les sinus sont encombrés de fragments déchiquetés où l'on retrouve les noyaux des cellules hépatiques. A leur intérieur pénètrent des polynucléaires en nombre très grand; une masse énorme de macrophages contiennent déjà presque tous de volumineux fragments hépatiques, bien délimités et se colorant en rose par l'éosine; ailleurs, on voit plusieurs macrophages entourer un même fragment de foie et accoler leurs noyaux à sa surface.

Au bout de 12 heures, la quantité de fragments libres a beaucoup diminué; on n'en voit guère où ne soit accolé un macrophage. Dans le protoplasma de ceux-ci, bon nombre de fragments hépatiques commencent à fixer d'une façon énergique le méthyl-orange.

Mais le phénomène le plus remarquable, à ce stade, est la destruction en masse des polynucléaires dans l'intérieur des macrophages; ceux-ci en sont souvent bourrés à éclater. Les polynucléaires y dégénèrent rapidement; dès maintenant leur rôle semble terminé.

Au bout de 24 heures, on ne trouve plus de fragments hépatiques libres; dans beaucoup de sinus les macrophages forment d'énormes plasmodia, occupant toute la largeur du sinus, avec noyaux périphériques et bourrés de fragments roses ou légèrement orangés enfermés dans de vastes vacuoles. Comme dans le

cas de la résorption intrapéritonéale du foie, on voit ces vacuoles se disposer petit à petit vers la périphérie de la cellule géante, puis se confondre avec le liquide ambiant. Là encore nous assistons à la fonte périphérique du plasmodium.

Au bout d'une semaine, la résorption des cellules paraît terminée et les macrophages, dépourvus de vacuoles, ne contiennent plus guère à ce moment qu'un peu de pigment hépatique.

Chez les lapins qui ont déjà subi un certain nombre d'injections antérieures, cette destruction du foie dans les sinus de la rate est infiniment plus rapide ; 24 heures après l'injection les sinus tranchent sur le reste de la pulpe par leur coloration d'un orangé vif. Il est facile de s'assurer que cet aspect est dû au fait que les macrophages sont démesurément bourrés de protoplasma hépatique, lequel, à leur intérieur, fixe avec intensité le méthyl-orange. En outre, on ne trouve plus à ce moment de fragments extracellulaires libres.

Un autre fait caractéristique est que chez ces mêmes animaux, les polynucléaires semblent ne jouer aucun rôle : ils n'englobent point de fragments hépatiques, et l'on n'observe plus, dans ce cas, leur destruction à l'intérieur des macrophages.

VI

RÉSUMÉ

L'injection du foie d'une espèce animale dans le péritoine d'une espèce différente donne lieu aux phénomènes suivants :

1° Le foie injecté se rassemble en amas sur l'épiploon, principalement sur sa portion glandulaire. Ils s'y résorbent graduellement, le temps nécessaire à cette résorption variant, selon leur taille, de 10 jours à 3 mois. Cette résorption est complète ;

2° Les cellules du foie injecté restent vivantes pendant 3 jours environ. Jusqu'à ce moment leurs noyaux ne se colorent pas en gouttes suspendues. Au contraire, elles sont tuées dès

qu'elles ont été englobées par les macrophages, cet englobement débutant aussitôt après l'injection. Après 3 jours, l'amas hépatique non encore phagocyté est frappé de nécrose de coagulation;

3° Les leucocytes polynucléaires jouent un certain rôle au début de la résorption des celulles hépatiques. Ils se chargent de protoplasma qui subit, à leur intérieur, la transformation éosinophile. Jamais ils n'englobent de noyau. Ils n'englobent que faiblement le pigment hépatique. Très souvent les polynucléaires chargés de débris hépatiques dégénèrent après 2 ou 3 jours. En tout cas, *tous*, au bout de 3 jours, sont détruits par les mononucléaires. On ne peut donc leur attribuer aucun rôle dans l'élaboration de l'anticorps;

4° La destruction des cellules hépatiques est exclusivement dévolue aux mononucléaires qui, progressivement, pénètrent jusqu'au centre de l'amas, disloquent les cellules du foie, les englobent et les digèrent dans de grandes vacuoles où le foie acquiert une affinité de plus en plus grande pour le méthyl-orange, à mesure que la digestion intracellulaire est plus avancée. Cette réaction microchimique est surtout très nette chez les animaux vaccinés. Les mononucléaires seuls avalent et détruisent les noyaux;

5° En même temps qu'ils détruisent le protoplasma hépatique, les mononucléaires se chargent de pigment qui se concentre autour du noyau du macrophage, entre ce noyau et les vacuoles digestives. Cet amas accompagne le noyau dans ses migrations à travers le protoplasma cellulaire : en effet, le noyau tend à se mettre en contact avec les fragments de protoplasma en voie de digestion;

6° Les macrophages en activité se groupent souvent pour former des plasmodia (cellules géantes). Qu'il s'agisse de ces plasmodia ou de phagocytes restés isolés, les vacuoles où s'est achevée la digestion intracellulaire, se disposent à la périphérie de l'élément. Le protoplasma de ce dernier subit la fonte phagolytique et le contenu des vacuoles se trouve ainsi déversé dans les humeurs ambiantes. Il y a là un phénomène tout à fait comparable à la sécrétion des glandes dites « par fonte cellulaire ». Tel est, peut-être, le mécanisme du passage, dans les humeurs, de la substance sensibilisatrice. Le même phénomène

s'observe dans la rate, lorsque l'on introduit le foie par voie veineuse ;

7° Les macrophages chargés de granulations hépatiques rentrent dans l'appareil lymphatique, soit qu'ils cheminent à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques aboutissant à l'épiploon, soit qu'ils rentrent directement dans la rate et les ganglions mésentériques en passant directement à travers l'endothélium péritonéal. Les deux voies sont également suivies ;

8° Ni dans l'exsudat ni à la surface de l'épiploon, on ne peut observer de digestion extracellulaire des celulles hépatiques. Dans les amas volumineux, dont le centre n'est atteint que tardivement par l'infiltration des mononucléaires, le magma hépatique demeure intact et compact pendant plus de 2 mois jusqu'au moment où intervient l'action phagocytaire ;

9° La résorption de l'amas est d'autant plus rapide que l'animal qui a subi l'injection est plus voisin de l'espèce qui a fourni le foie. La résorption la plus rapide s'effectue lorsque l'on injecte à un cobaye le foie d'un autre cobaye ; ce même animal résorbe plus lentement le foie de lapin. C'est le foie de grenouille qui est le plus long à disparaître. La résorption chez les animaux ayant subi des injections répétées, s'accomplit incomparablement plus vite que chez les animaux neufs.

10° Autour des amas de foie se développent des fibres conjonctives jeunes. Cette réaction fibreuse, très peu intense chez les animaux neufs, est très énergique chez les vaccinés. Chez les neufs, elle s'effectue grâce à de petits leucocytes mononucléaires (fibroblastes) qui s'étalent à la surface des filaments de fibrine qu'ils englobent. Les fibrilles conjonctives résultent d'une élaboration interne du protoplasma, suite d'un acte de digestion intracellulaire. Chez les animaux déjà inoculés antérieurement, le tissu fibreux se constitue par un afflux énorme de fibroblastes qui entourent les cellules géantes chargées de pigment, celles-ci s'unissent à eux au moyen de fins prolongements protoplasmiques. Beaucoup de cellules géantes se fixent de la sorte et deviennent partie intégrante du tissu fibreux nouvellement formé.

Ces fibroblastes sont des leucocytes mononucléaires (cellules épithélioïdes) issus des vaisseaux lymphatiques et ne proviennent pas du tissu conjonctif préexistant. A ce niveau je n'ai guère observé de karyokinèses ;

L'injection du foie dans les veines donne lieu aux phénomènes suivants :

11° Une partie du foie est arrêtée dès le début dans les vaisseaux sanguins du poumon. Les grumeaux hépatiques, d'abord pénétrés de polynucléaires, sont rapidement disloqués et englobés par les mononucléaires qui au bout de 24-36 heures les charrient dans les organes lymphoïdes.

Les cellules de Kupfer du foie arrêtent, également dès le début, une portion des cellules hépatiques injectées. La destruction graduelle du protoplasma et du pigment hépatique s'y effectue en 8 ou 10 jours;

12° Le lieu principal de la destruction des cellules hépatiques introduites par voie sanguine, se trouve dans les sinus sanguins de la rate. On y observe la même série de faits que sur l'épiploon; seulement ici la résorption totale est plus rapide et ne semble guère dépasser une semaine. Elle est encore bien plus rapide chez les vaccinés. Le rôle destructeur est dévolu ici aux gigantophagocytes de la pulpe. Ils digèrent le foie dans de grandes vacuoles, en s'associant sous forme de vastes plasmodia. Vers la fin du processus ces cellules géantes subissent une phagolyse partielle. Dès les premières heures qui suivent l'injection, il s'opère dans les macrophages une destruction intense de polynucléaires. Il est, dès lors, hors de doute que les leucocytes mononucléaires issus des organes lymphoïdes sont les agents exclusifs de la résorption des cellules hépatiques.

Les ganglions mésentériques semblent jouer, dans cette résorption, un rôle moins actif que la rate, du moins lorsque le foie est injecté par voie veineuse. La moelle osseuse semble rester absolument inactive.

13° Les injections de foie déterminent un certain nombre de lésions toxiques sur les cellules de l'organisme, tels que des phénomènes de néphrite portant exclusivement sur les cellules des tubuli. La modification la plus intéressante entraînée par ces injections est la transformation myéloïde (non totale) de la rate, telle qu'elle a été observée et décrite pas Dominici.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE VIII

Fig. 1. — Injection de foie de lapin dans le péritoine du cobaye. Exsudat péritonéal 24 heures après l'injection. Transformation éosinophile de la substance hépatique englobée par les polynucléaires.

Fig. 2. — Injection de foie de lapin dans le péritoine d'un cobaye. Coupe d'un grumeau hépatique 24 heures après l'injection. Zone moyenne. Les macrophages s'insinuent entre les cellules hépatiques. Pénétration des polynucléaires dans le protoplasma hépatique.

Fig. 3. — *Idem.* Zone périphérique. Englobement de fragments hépatiques par les macrophages chargés de grains de pigment.

Fig. 4. — Injection de foie de cobaye à un cobaye. Portion d'une coupe d'un grumeau hépatique de 24 heures. Zone périphérique, complètement disloquée. Cellules hépatiques incluses dans les macrophages.

Fig. 5. — Injection de foie de lapin dans le péritoine d'un cobaye, coupe d'un grumeau de 3 jours. Lacune interstitielle; on y voit des polynucléaires chargés de débris, en karyolyse; des macrophages digérant des fragments de foie, des polynucléaires, du pigment hépatique.

PLANCHE IX

Fig. 6. — *Idem.* Zone périphérique. Plasmodium de macrophages contenant des fragments de foie. En bien des points, la digestion intracellulaire est achevée; les vacuoles sont claires; elles commencent à se disposer à la périphérie du plasmodium.

Fig. 7. — Injection de foie de grenouille dans le péritoine d'un cobaye ayant subi plusieurs injections antérieures. Coupe d'un grumeau de cinq jours. Cellule géante attaquant la masse hépatique. Elle contient des fragments hépatiques. A la périphérie, formation de vacuoles. Le plasmodium émet par sa périphérie des prolongements qui commencent à se fixer à ceux des fibroblastes immigrés.

Fig. 8. — Injection de foie de grenouille dans les veines d'un lapin. Coupe

du foie 4 heures après l'injection. Les cellules de Kupfer sont chargées de pigment hépatique.

Fig. 9. — Injection de foie de cobaye dans les veines d'un lapin. Coupe de la rate 24 heures après l'injection. Dans un sinus, on voit les fragments de foie entourés et partiellement englobés par les macrophages. Abondante destruction de polynucléaires dans l'intérieur des macrophages.

Le cours et les manipulations du service d'analyse et de chimie appliquée à l'hygiène (3e année), commenceront en novembre.

Ce cours s'adresse spécialement aux pharmaciens, médecins et chimistes industriels.

S'adresser pour renseignements à l'Institut Pasteur, 26, rue Dutot.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

16me ANNÉE 25 AOUT 1902 N° 8

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SUR LA RECHERCHE ET SUR L'EXISTENCE DE L'ARSENIC DANS L'ORGANISME

PAR M. GABRIEL BERTRAND

Jusqu'aux recherches publiées en 1899 et 1900, par M. Arm. Gautier[1], on admettait, d'une manière absolue, l'absence de l'arsenic dans le corps de l'homme. Les quelques cas où des traces de cet élément avaient été signalées s'expliquaient sinon par l'impureté des réactifs employés pour les recherches, du moins par quelque circonstance accidentelle, comme l'ingestion de médicaments, d'aliments ou de poussières contenant de l'arsenic.

En démontrant que les glandes thyroïdes et quelques autres parties de l'homme et des animaux renferment normalement de petites quantités d'arsenic, M. Arm. Gautier a transformé et défini l'aspect de cette question importante de médecine légale. Bien mieux, il a fait entrer l'étude de l'arsenic dans le domaine de la physiologie.

Mais, pour que cette démonstration, avec toutes ses conséquences, conserve sa valeur, il faut que le fait principal sur lequel elle repose, c'est-à-dire l'existence normale de l'arsenic dans l'organisme, reste établie d'une façon indiscutable. Or, plusieurs mémoires, dus à Hödlmoser[2], Ziemke[3], Cerny[4],

1. Sur l'existence normale de l'arsenic chez les animaux et sa localisation dans certains organes, *C. R. Acad. d. Sciences*, t. CXXIX, p. 929-936, 1899.

Localisation, élimination et origines de l'arsenic chez les animaux, *C. R. Acad. d. Sciences*, t. CXXX, p. 284-291, 1900.

La fonction menstruelle et le rut des animaux. Rôle de l'arsenic dans l'économie, *C. R. Acad. d. Sciences*, t. CXXXI, p. 361-367, 1900.

2. Enthalten gewisse Organe des Körpers physiologischer Weise Arsen. *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, t. XXXIII, p. 329-344, 1901.

3. *Apotheker Zeitung*, t. XVII, 1902.

4. Ueber das Vorkommen von Arsen im thierischen Organismus, *Zeitsch. für physiol. Chemie*, t. XXXIV, p. 408-416, 1902.

viennent de mettre les assertions de M. Arm. Gautier formellement en doute.

Vivement intéressé par le rôle possible de l'arsenic dans l'organisme vivant, rôle comparable sous certains rapports à celui du zinc, de l'iode, du manganèse et de quelques autres éléments qui n'existent, eux aussi, qu'en très petites proportions, j'ai été conduit à répéter, pour ma part, les expériences de M. Arm. Gautier. Les résultats auxquels je suis parvenu me paraissent si démonstratifs que je crois utile de les communiquer.

Mes premiers essais ont été effectués en janvier 1900, avec des glandes thyroïdes de veau achetées à l'abattoir. Après avoir vérifié qu'un poids de réactifs bien supérieur à celui qui devait être employé dans une expérience ne fournissait pas trace d'arsenic, j'ai examiné comment se comportait la méthode de destruction et de recherche de M. Arm. Gautier en me servant d'abord de 100 grammes de muscles de lapin, puis de 100 grammes des mêmes muscles additionnés de 1/10 de milligramme d'arsenic : les muscles seuls ne donnèrent rien ; les autres fournirent un enduit arsenical absolument identique à celui qu'on obtenait en introduisant directement 1/10 de milligramme d'arsenic dans l'appareil de Marsh.

Trente grammes de glandes thyroïdes furent alors attaqués avec soin : ils ne donnèrent aucune trace d'arsenic; il en fut de même dans un second essai.

Supposant alors qu'il y avait dans le procédé de destruction quelque particularité dont je n'avais pas saisi l'importance, j'eus recours aux conseils personnels de M. Arm. Gautier : le tissu thyroïdien est des plus difficile à détruire et j'avais trop ménagé l'emploi de l'acide nitrique.

De nouveaux essais furent entrepris d'après cette indication; ils fournirent des anneaux très appréciables d'arsenic. Ces essais furent répétés, avec le même succès, dans mon laboratoire, par M. Guglielmetti, professeur de toxicologie à la Faculté de médecine de Montevideo, et par M. Heupel, mon préparateur. Comme les quantités d'acides employées dans ces nouveaux essais ne s'écartaient pas de celles de l'expérience de contrôle, je me crus en droit d'admettre l'existence de l'arsenic dans la glande thyroïde de veau.

C'est quelques mois plus tard que parut le mémoire de Hödlmoser. L'auteur énumère dans ce mémoire près de 20 expériences, entreprises chacune avec 85 à 200 grammes de glandes thyroïdes humaines. *Sans exception*, déclare-t-il, *les résultats ont été négatifs*.

Il y avait bien quelquefois des traces à peine perceptibles d'arsenic, mais, ajoute Höldmoser, ces traces n'apparaissaient pas plus souvent avec les glandes thyroïdes qu'avec les foies des mêmes individus, examinés comparativement. Et il conclut en admettant que les résultats positifs de M. Arm. Gautier sont peut-être en rapport avec la constitution géologigue du sol.

Des recherches et des résultats identiques à ceux de Hödlmoser ont été publiés plus récemment encore par Ziemke et par Cerny.

La lecture de ces publications contradictoires, et aussi certaines remarques faites au cours de mes premiers essais, m'ayant mis en défiance contre le procédé de recherche de l'arsenic, je repris successivement l'étude du procédé de Marsh, de la destruction des matières organiques et, finalement, de l'arsenic normal.

En suivant les indications que je vais décrire, on pourra retrouver des quantités infinitésimales d'arsenic et se convaincre de la présence de ce métalloïde dans l'organisme normal.

Je suis arrivé, en effet, à perfectionner dans ses détails d'exécution la méthode bien connue de Marsh au point qu'il est possible d'obtenir des anneaux visibles avec des poids aussi minimes qu'un millième et même un demi-millième de milligramme d'arsenic.

Pour atteindre une sensibilité aussi grande, il faut observer plusieurs précautions. Tout d'abord, l'arsenic doit être rassemblé dans un très petit volume de liquide. J'opère ordinairement avec des volumes tels qu'à la fin de l'opération il n'y ait pas plus de 30 à 60 c. c. de liquide dans l'appareil producteur d'hydrogène. C'est par exception que ce volume atteint le double.

Il faut ensuite débarrasser l'appareil de toute trace d'oxygène; sans cela, une partie ou la totalité de l'arsenic mis en liberté s'oxyde et passe à l'état d'acide arsénieux beaucoup plus difficile et même impossible à apercevoir. On atteint

aisément ce but en purgeant l'appareil, une fois monté et garni de zinc, avec un bon courant de gaz carbonique pur[1]. Si on voulait purger avec l'hydrogène produit directement dans l'appareil, on serait conduit, à moins de manœuvres spéciales, faciles à concevoir, à laisser dans celui-ci une quantité notable de liquide acide qui diluerait d'autant la solution arsenicale. On gagne d'ailleurs beaucoup de temps en opérant comme je l'indique; avec un bon courant d'anhydride carbonique, il suffit de quelques minutes pour obtenir une purge parfaite[2], ce qu'on ne pourrait faire, avec l'ancienne technique, en moins d'une heure, au minimum. Quand l'appareil est bien purgé d'air, on verse sur le zinc 1 ou 2 gouttes de solution de chlorure de platine diluées dans 10 c. c. environ d'acide sulfurique au 1/5, et l'on attend une dizaine de minutes avant d'introduire le liquide arsenical.

Comme tubes à analyse, il faut prendre des tubes de verre de petit diamètre et très finement étirés. Si l'on recherche, par exemple, des quantités notablement inférieures à 1/100 de milligramme, il est bon de prendre des tubes n'ayant pas plus de 1 millimètre de diamètre intérieur.

Après les avoir bien lavés à l'acide sulfurique chaud ou à l'eau régale, puis à l'eau, à l'alcool et à l'éther, on les dessèche complètement. On les coupe d'une longueur telle que l'extrémité libre soit à 10 ou 15 centimètres de l'endroit où se formera l'anneau; enfin, on étire cette extrémité très finement, sur plusieurs centimètres, pour éviter la diffusion de l'air dans leur intérieur, pendant l'opération. Faute de ce soin, des enduits très faibles d'arsenic deviennent invisibles en s'oxydant au fur et à mesure de leur production[3].

Il n'est pas nécessaire de chauffer le tube à analyse à une température plus élevée que le rouge naissant, ni même, semble-t-il, sur une grande longueur. Cependant, dans presque

1. Comme on peut en trouver dans les bouteilles d'acide carbonique liquide. Le gaz que j'employais contenait 0,08 0/0 d'oxygène.

2. Au commencement de la purge, on sépare le tubes à analyse, pour que le gaz passe plus facilement.

3. Cette oxydation s'opère même assez vite à froid dans les tubes où on conserve les anneaux, si on n'a pas pris la précaution de sceller les tubes pleins d'hydrogène sec. A la place du dépôt noir, bien visible du métalloïde, on n'a plus alors qu'une trace blanchâtre d'acide arsénieux, quelquefois imperceptible, même sur un fond noir.

toutes mes expériences, j'employais une petite rampe de 20 centimètres de longueur, très commode, de préférence au bec Bunsen à flamme plate qui me servait antérieurement.

Il est utile de dessécher le courant gazeux, au sortir du flacon, en le faisant passer à travers une colonne d'ouate préalablement chauffée à + 110-120°. La cellulose ainsi déshydratée retient énergiquement la vapeur d'eau sans agir sur la composition du gaz.

Enfin, pour éviter l'étalement de l'enduit arsenical sur une trop grande surface du tube à analyse, ce qui arrive aisément avec les tubes capillaires à parois épaisses, il est bon de favoriser la condensation immédiate des vapeurs arsenicales en entourant le tube, en un point convenablement choisi, d'un petit réfrigérant.

Celui-ci se compose tout simplement d'une bande de papier à filtrer, de 4 à 5 millimètres de largeur; cette bande fait plusieurs fois le tour du tube et reçoit de l'eau, goutte à goutte, d'un petit réservoir placé au-dessus. L'excès d'eau s'écoule par l'extrémité libre de la bande qui pend sur une longueur de 1 à 2 centimètres. L'enduit d'arsenic, rassemblé ainsi sur un très petit espace, ne risque plus d'échapper à l'observation. Avec des quantités de métalloïde supérieures au 1/100 de milligramme et des tubes à paroi mince, l'usage du petit réfrigérant n'est plus nécessaire.

En adjoignant toutes les précautions qui viennent d'être énumérées à celles décrites antérieurement par M. Arm. Gautier[1], on peut obtenir, avec 1/1000 de milligramme d'arsenic, un anneau noir, nettement visible, de plusieurs millimètres de longueur.

On comprend qu'avec un procédé de recherche aussi délicat, il soit très difficile de trouver des réactifs exempts d'arsenic. Cela est vrai surtout pour l'acide nitrique. Le plus pur que j'ai pu me procurer dans le commerce, et qui avait été préparé spécialement, donnait encore près de trois centièmes de milligramme de son poids de métalloïde par kilogramme. Il fut impossible de le débarrasser plus complètement par 3 distillations simples dans une cornue de verre. C'est seulement par 2 nouvelles distillations, en présence, chaque fois, de 1/10 de son poids

1. *Annales de Chimie et de Physique*, 5e série, t. VIII, p. 384 (1876).

d'acide sulfurique pur, qu'on put abaisser cette teneur à moins de 1/300.000.000, c'est-à-dire au point de ne plus trouver que 1/1000 de milligramme d'arsenic dans 300 grammes d'acide[1].

La méthode de destruction de la matière organique qui m'a donné les meilleures résultats est celle de M. Arm. Gautier[2]. Les modifications qu'on a récemment proposé de faire subir à cette méthode et qui mettent en jeu une grande quantité d'acide sont mauvaises pour l'étude de l'arsenic normal de l'organisme. Comme j'ai pu m'en convaincre, en effet, par des expériences directes, comme on l'a vu d'ailleurs, à propos de la purification des réactifs, il y a toujours des traces d'arsenic entraînées par les vapeurs acides : de sorte que les modifications proposées, qui conduisent à des solutions complètes de la matière organique, et qui paraissent très bonnes lorsqu'on recherche des quantités appréciables d'arsenic, ne valent plus rien pour des proportions infinitésimales du métalloïde.

En attaquant, par exemple, 50 grammes de foie de veau additionnés de 1/100 de milligramme d'arsenic, par 10 grammes d'acide sulfurique et 45 d'acide nitrique, dans une première expérience; par 50 grammes d'acide sulfurique et 200 d'acide nitrique, dans une seconde, on a obtenu un anneau représentant à très peu près la quantité d'arsenic introduite dans le premier cas, tandis qu'il n'y avait rien ou tout au plus une trace douteuse dans le second.

Au lieu d'acide nitrique seul, pour conduire l'attaque, j'ai trouvé préférable d'employer un mélange de 10 parties d'acide nitrique avec 1 d'acide sulfurique. Ce mélange pénètre mieux la masse charbonneuse et, n'étant pas aussi volatil que l'acide nitrique, il permet, vers la fin de l'attaque, de laver plus facilement les parois chaudes de la capsule. A part cette légère variante, on opère exactement d'après les indications de M. Arm. Gautier; il y a un peu plus d'acide sulfurique dans le liquide d'extraction, mais cela ne présente aucun inconvénient.

Pour déceler des traces d'arsenic aussi minimes que celles

1. L'examen de l'acide se fait en évaporant dans une capsule de porcelaine contrôlée 300 grammes de réactif, versés par portions, avec 20 grammes d'acide sulfurique pur. L'évaporation est poursuivie jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'une quinzaine de grammes d'acide sulfurique ; on dilue dans 4 parties d'eau et, après refroidissement, on introduit dans l'appareil de Marsh.

2. *Comptes rendus Ac. d. Sciences*, t. CXXIX, p. 936-938, 1899.

indiquées plus haut, il ne faut introduire dans l'appareil de Marsh que des produits bien attaqués, exempts de matières organiques. Lorsque le précipité, obtenu par l'action du gaz sulfhydrique, donne avec l'ammoniaque une solution brune, chargée de quantités notables de matières organiques, on attaque le résidu laissé par l'évaporation de la solution ammoniacale exactement de la même manière que la matière primitive.

Si la solution aqueuse, séparée par filtration d'un peu de produits humiques, est maintenant incolore ou presque incolore, on l'évapore à sec et le résidu, dissous dans l'acide sulfurique au 1/5, est versé dans le flacon producteur d'hydrogène. Si, au contraire, la solution aqueuse est fortement colorée en jaune, comme cela arrive quelquefois quand on n'est pas très exercé dans l'emploi de la méthode de destruction, il faut précipiter à nouveau l'arsenic par l'hydrogène sulfuré.

Maintenant que j'ai rapporté mes observations personnelles concernant la recherche de l'arsenic dans les matières organiques, je vais indiquer les résultats que j'ai obtenus en appliquant ces observations à l'étude de l'arsenic normal. A la question : y a-t-il, oui ou non, de l'arsenic dans l'organisme ? je vais répondre d'une façon positive et, je l'espère, à l'abri des critiques.

J'ai évité de me servir pour cette étude de glandes thyroïdes et de tissus humains, parce qu'il est presque impossible d'affirmer que les individus servant aux expériences n'ont jamais été soumis à quelque médication ou contamination arsenicale. J'ai évité aussi les recherches sur le cheval, parce que celui-ci est quelquefois traité par l'acide arsénieux et qu'on ne peut être sûr, par suite, de l'origine naturelle de l'arsenic retrouvé dans ses organes.

J'ai recherché d'abord l'arsenic dans des glandes thyroïdes de veau et de porc, puis dans les soies de ce dernier animal, les plumes de l'oie, la corne du bœuf, les poils et les ongles du chien, etc. Je n'ai pas tardé à remarquer que les tissus kératiniques étaient relativement très riches en arsenic, beaucoup plus même que les glandes thyroïdes.

39 grammes de poils noirs, par exemple, provenant de trois chiens, fournirent un bel anneau de près d'un dixième de milligramme d'arsenic [1].

1. Employé pour la destruction : 100 grammes du mélange acide.

50 grammes de corne de bœuf, pulvérisée au laboratoire, donnèrent même l'énorme proportion de deux dixièmes et demi de milligramme d'arsenic, c'est-à-dire de cinq milligrammes de ce métalloïde par kilogramme [1].

Mais, comme tous ces objets d'étude, malgré les précautions dont je m'entourais, ne présentaient pas encore pour moi toute la sécurité désirable, je m'adressai à M. Nocard. Le distingué professeur de l'école d'Alfort voulut bien m'envoyer des pièces provenant d'un veau, âgé d'un mois, né à l'Ecole vétérinaire, et d'une génisse de 18 mois, d'origine connue, achetée très jeune, et élevée également dans ses écuries d'étude.

Les résultats obtenus avec les poils et les ongles de ces deux animaux, mais surtout avec les cornes de la génisse, furent tout à fait positifs. Vingt grammes de substance, dont la destruction exigeait seulement une soixantaine de grammes du mélange acide, suffirent dans tous les cas pour obtenir des anneaux très nets d'arsenic.

Celui qui provenait des cornes représentait environ deux centièmes de milligramme, soit cent fois davantage que n'en contenaient les réactifs employés.

La peau et même le foie [2] fournirent aussi des traces de métalloïde (quelques millièmes de milligramme). D'une manière générale, les tissus de la génisse étaient plus riches que les tissus correspondants du veau. Il semble qu'il y ait accumulation d'arsenic avec l'âge, car les cornes du bœuf étaient à leur tour, comme on peut s'en rendre compte par les chiffres indiqués plus haut, beaucoup plus riches que celles de la génisse. Il semble aussi, en comparant la série des expériences, que les poils noirs soient plus riches que les poils blancs. Il serait curieux d'examiner si les tissus kératiniques représentent une réserve d'arsenic et si les cellules pigmentophages, découvertes par M. Metchnikoff [3], jouent un rôle dans les migrations de cet élément à travers l'organisme.

Je puis ajouter encore une preuve convaincante de l'existence normale de l'arsenic dans l'organisme. Grâce à l'obligeance de

1. Employé pour la destruction : 165 grammes du mélange acide.

2. Le foie est très facile à détruire : pour 50 grammes, on employait seulement 5 grammes d'acide sulfurique et 50 grammes du mélange acide. Pour la peau, on a pris le double de ces quantités.

3. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XV, p. 865-979 (1901).

S. A. S. le prince de Monaco, j'ai pu examiner des glandes thyroïdes provenant de phoques (*Phoca barbata*), capturés au voisinage du Spitzberg, dans des conditions, par conséquent, où on ne peut même pas invoquer la contamination industrielle de l'atmosphère respirée par les animaux. Cinquante grammes de ces glandes, attaquées par 75 grammes de mélange acide et 10 grammes d'acide sulfurique, ont donné un anneau très net, d'au moins un centième de milligramme.

Je n'insisterai pas trop, en terminant, sur les variations de la teneur en arsenic que paraissent éprouver les glandes thyroïdes quand on compare les résultats de M. Armand Gautier avec ceux obtenus par Hödlmoser, Ziemke, Cerny et moi-même. J'estime, en effet, que les dosages de quantités aussi minimes d'arsenic sont si délicates, que les comparaisons ne peuvent être faites utilement que par un même observateur, bien en possession de la méthode.

La seule conclusion qu'on puisse alors retenir à ce sujet est uniquement d'ordre qualitatif. Or, les contradicteurs mêmes de M. Armand Gautier ont signalé, l'un dans plusieurs de ses essais, l'autre dans presque tous, l'apparition de traces arsenicales. La crainte, très légitime d'ailleurs, d'avoir introduit ces traces au cours des opérations, a pu seule empêcher ces savants de conclure avec certitude en faveur de l'existence de l'arsenic dans l'organisme.

Après mes expériences, cette crainte ne peut plus, je crois, persister. La richesse des tissus kératiniques en arsenic est tellement au-dessus, dans certains cas, des erreurs expérimentales, qu'il ne reste plus qu'à envisager l'importance et le rôle physiologique de cet intéressant métalloïde.

RECHERCHES SUR LE PHÉNOMÈNE DE L'AGGLUTINATION

Variabilité de l'aptitude agglutinative et de la fonction agglutinogène. — Leurs relations entre elles ; leurs rapports avec la mobilité des microbes.

PAR MM. CHARLES NICOLLE ET M. TRENEL (DE ROUEN).

L'*aptitude agglutinative* (agglutinabilité) est une propriété très commune chez les êtres vivants unicellulaires. Nous connaissons aujourd'hui un grand nombre de microbes et de cellules libres qui présentent la propriété de se réunir en amas sous l'influence d'agents divers; il paraît même probable qu'à un degré évidemment variable tous les microbes et toutes les cellules libres jouissent de propriétés analogues.

L'agglutination des éléments sensibles peut être réalisée par des substances très diverses : composés chimiques en solution; produits de l'activité des microbes [1]; sérums normaux; sérums spécifiques provenant d'organismes animaux infectés spontanément ou inoculés avec des cellules, microbes, produits cellulaires ou produits microbiens. Ces sérums sont les corps qui présentent au plus haut point la propriété agglutinante.

La *fonction agglutinogène* semble aussi répandue que l'aptitude agglutinante. Nous savons en effet qu'il est presque toujours possible de provoquer dans les humeurs des animaux inoculés avec des microbes ou des cellules l'apparition d'un pouvoir agglutinant vis-à-vis de ces éléments.

Mais si l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène paraissent constituer des propriétés inhérentes à toutes ou presque toutes les cellules libres, microbiennes ou non, ces deux propriétés offrent des différences considérables suivant qu'on les étudie sur tel ou tel de ces éléments. Ces différences sont si marquées qu'elles pourraient tromper un observateur superficiel. Quel rapport, en effet, semble-t-il exister à première vue entre le phénomène de l'agglutination du bacille typhique de

1. C. NICOLLE, *Soc. de Biologie*, 12 novembre 1898; MALVOZ, ces *Annales*, 25 août 1899.

nos laboratoires par le typhosérum, dont une goutte peut précipiter mille, dix mille et même un million de fois son volume de culture [1], et l'action si incertaine de certains sérums spécifiques capables seulement d'agglutiner les cellules ou les microbes correspondants lorsqu'ils sont ajoutés à ceux-ci à dose égale ou manifestement supérieure ?

Cette différence vraiment énorme dans l'intensité d'un même phénomène est un fait d'une importance très grande. Si une explication en peut être donnée, la connaissance du mécanisme du phénomène de l'agglutination en sera certainement éclaircie.

Nous retrouvons, d'ailleurs, des variations analogues, lorsqu'au lieu de comparer, au point de vue des propriétés agglutinable et agglutinogène, microbes et cellules d'espèces différentes, nous étudions diverses races ou divers échantillons d'une espèce microbienne.

C'est là un fait qui commence à être bien connu pour certains microbes, en particulier pour le bacille typhique. L'existence de races ou d'échantillons de bacille d'Éberth peu ou pas sensibles à l'action du sérum typhique (bacilles typhiques inagglutinables) domine aujourd'hui le problème de l'analyse bactériologique des eaux. Comment distinguer d'espèces voisines, mais banales, et sans intérêt au point de vue de l'hygiène, un bacille typhique légitime auquel manque la propriété la plus caractéristique de ce microbe ? La connaissance des causes qui font varier l'agglutinabilité du bacille d'Éberth rendra plus facile le diagnostic de ses formes anormales.

Par ce que nous connaissons du bacille typhique, mieux étudié à ce point de vue que les autres bactéries, nous savons que la fonction agglutinogène varie tout autant que l'agglutinabilité suivant que l'on considère tel ou tel échantillon de ce microbe.

Enfin, les cultures successives d'un même microbe offrent souvent des différences considérables au point de vue de son agglutinabilité. Là encore, c'est principalement l'étude du bacille typhique qui nous a fait connaître ces variations ; un échantillon de bacille d'Éberth, primitivement peu sensible à l'action du sérum, le devient de plus en plus en vieillissant.

1. Van de Velde, *Soc. de Biologie*, 9 octobre 1897.

Nos expériences personnelles confirment cette grande variabilité des propriétés agglutinative et agglutinogène signalée déjà par les auteurs pour les diverses espèces microbiennes et pour les races ou échantillons d'origines différentes d'une même espèce, ainsi que la sensibilité variable à l'action du sérum des cultures successives d'un même microbe.

Elles nous ont, en outre, permis de mettre en évidence, ce qui n'avait pas été fait avant nous, les variations du pouvoir agglutinogène d'un même microbe placé dans des conditions de culture différentes.

Les plus importantes de ces expériences seront relatées au cours de notre travail.

Nous nous sommes limités dans nos recherches à l'étude des conditions et des causes de la variabilité des propriétés agglutinative et agglutinogène chez les microbes, et nous avons laissé de côté la partie du problème qui concerne l'agglutination des cellules libres de l'organisme. Ces éléments paraissent se comporter à ce point de vue de la même manière que les microbes faiblement agglutinables et faiblement agglutinogènes.

*
* *

VARIABILITÉ DE L'APTITUDE AGGLUTINATIVE CHEZ LES DIFFÉRENTES ESPÈCES MICROBIENNES ; CHEZ LES ÉCHANTILLONS D'UNE MÊME ESPÈCE ; CHEZ UN MÊME MICROBE DANS LES DIVERSES CONDITIONS DE SA VIE. — RAPPORT DE CES VARIATIONS AVEC LA MOBILITÉ DES MICROBES

1° *Variabilité de l'aptitude agglutinative chez les différentes espèces microbiennes.* — Il existe, au point de vue de leur aptitude à se mettre en amas sous l'influence des sérums spécifiques, les différences les plus considérables entre les diverses espèces microbiennes. Nous avons déjà signalé ce fait. Pour en trouver une explication, il nous paraît utile de parcourir rapidement la liste des microbes fortement ou faiblement agglutinables étudiés par les auteurs et par nous-mêmes.

Les microbes qui, suivant les auteurs, présentent au plus haut degré l'aptitude agglutinative sont : le bacille typhique, les diverses races du *B. coli*, les microorganismes voisins de ces deux espèces (bacilles éberthiformes ou coliformes), le bacille de la psittacose, les vibrions cholériques ou cholérifor-

mes, le *Proteus vulgaris*, le pyocyanique. On peut dire que ces microbes offrent une sensibilité extrême à l'action des agglutinines spécifiques ; il suffit d'une trace de ces substances pour les mettre en amas ; et l'intensité du phénomène, lorsqu'il s'agit d'échantillons types de ces microbes, semble dépendre moins de leur sensibilité au réactif, laquelle est toujours extrême, que des variations du sérum employé (que ce sérum provienne d'individus ou d'animaux infectés spontanément, ou que ce soit un sérum expérimental).

Infiniment moins sensibles, et d'une sensibilité souvent variable suivant les échantillons examinés ou les conditions de vie d'un même échantillon, sont les microbes suivants : bacille du tétanos, vibrion septique, *B. Chauvœi*, bacille tuberculeux, bacilles de la diphtérie, du charbon, de la morve, de la peste, champignon du muguet et quelques autres. Il faut parfois, pour les agglutiner, employer des sérums expérimentaux très actifs (sérums antitoxiques du tétanos, de la diphtérie, etc.). Le sérum de l'homme ou des animaux infectés spontanément n'a sur eux qu'une action faible, incertaine ou nulle.

D'autres microbes enfin se montrent d'une sensibilité si légère à l'action des sérums spécifiques qu'il semble, pratiquement au moins, qu'ils y soient parfaitement réfractaires. Tels sont, pour en citer seulement quelques-uns, le bacille de l'influenza, le meningocoque, le bacille de Friedlander, le bacille de Fritsch, etc.

Nos expériences personnelles confirment, pour un certain nombre de ces microbes, les données des auteurs. Entre nos mains, le bacille typhique des laboratoires. plusieurs races de *B. Coli*, le bacille de la psittacose, les vibrions cholériques, le pyocyanique se sont montrés d'une sensibilité parfaite vis-à-vis des sérums correspondants. Il en a été de même du b. cyanogène sur lequel nous croyons avoir été les premiers à expérimenter et qui s'agglutine très facilement sous l'action du sérum d'un lapin inoculé avec ses cultures.

Nous n'avons, au contraire, obtenu que très difficilement l'agglutination du bacille tétanique par l'action du sérum d'une poule inoculée avec des doses considérables de cultures tétaniques. Et, d'autre part, le bacille de Friedlander et le bacille diphtérique n'ont été nullement impressionnés par le sérum

d'animaux infectés avec ces microbes (cobaye et lapin pour le bacille de Friedlander, rat ayant reçu des quantités très considérables de cultures pour le bacille diphtérique), même en employant ces sérums à la dose d'une partie pour une partie de culture[1].

L'explication de cette grande variabilité de l'aptitude agglutinative dans la série des espèces microbiennes nous paraît simple. Le bacille typhique, le *B. Coli*, le bacille de la psittacose et les bactéries voisines, les vibrions cholériques et cholériformes, le pyocyanique, le b. cyanogène, le *Proteus* sont des microbes d'une mobilité parfaite et ciliés. Le bacille tuberculeux, les bacilles du tétanos et du charbon symptomatique, le vibrion septique ne sont que faiblement mobiles, et dans des conditions particulières de leur développement. Les autres microbes ne présentent aucune mobilité.

Si l'on considère les diverses espèces microbiennes étudiées jusqu'à ce jour, l'aptitude agglutinative paraît donc en rapport avec la mobilité. Les microbes très mobiles sont très agglutinables; les microbes peu ou point mobiles sont peu ou point sensibles à l'action des sérums spécifiques. C'est là un fait qu'il convient de retenir;

2° *Variabilité de l'aptitude agglutinative des races ou échantillons d'une même espèce microbienne.* — Certains microbes, parmi ceux qui sont sensibles à l'action des sérums spécifiques, présentent des variations dans leur aptitude agglutinative, suivant qu'on examine tel ou tel échantillon ou telle et telle race. Le fait est bien connu en ce qui concerne le bacille typhique. Les auteurs ont décrit, principalement dans les eaux, des races peu ou point agglutinables de ce microbe. Il est possible que dans ces cas, la perte de l'aptitude agglutinative soit définitive et qu'il s'agisse bien là de races particulières caractérisées avant tout par l'absence de cette propriété. Mais il se peut également que la perte de l'agglutinabilité ne soit chez ces microbes qu'un phénomène transitoire, et que soit spontanément, soit expérimentalement, l'aptitude agglutinative leur puisse être restituée. Toutes les fois que l'étude d'un bacille typhique inagglutinable a pu être prolongée pendant un certain temps, l'aptitude agglutinative, d'abord absente, s'est peu à peu régénérée.

1. Voir C. Nicolle, ces *Annales*, 1898, p. 186 et suivantes.

L'existence de races définitivement inagglutinables n'est donc point absolument démontrée ; aussi, jusqu'à nouvel ordre, la question des variations de l'aptitude agglutinative du bacille typhique, suivant les échantillons examinés, nous paraît-elle se confondre avec celle des variations de l'agglutinabilité d'un même échantillon de ce microbe examiné dans les différentes conditions de sa vie.

Et ce que nous disons du bacille typhique peut également se dire, jusqu'à nouvel ordre, des autres espèces microbiennes, moins bien connues à ce point de vue que le bacille d'Éberthi.

3° *Variabilité de l'aptitude agglutinative d'un même microbe dans les diverses conditions de sa vie.* — Deux microbes seulement ont été étudiés jusqu'à présent à ce point de vue : le bacille tuberculeux et le bacille typhique[1].

MM. Arloing et P. Courmont ont montré que le bacille tuberculeux, insensible dans les conditions ordinaires de sa vie saprophyte à l'action des divers sérums tuberculeux, pouvait être agglutiné par ceux-ci lorsqu'on le cultive dans des conditions spéciales, et ils ont indiqué la technique à suivre pour arriver à ce résultat. Dans les cultures homogènes, utilisées depuis leurs travaux pour le séro-diagnostic de la tuberculose, le bacille de Koch se présente sous forme de bacilles parfaitement isolés les uns des autres et *mobiles*. En même temps qu'il est devenu mobile, le bacille tuberculeux est devenu agglutinable. Mobilité et agglutinabilité vont donc absolument de pair dans ce cas encore, et, phénomène intéressant que nous retrouverons à propos du bacille typhique, l'aptitude agglutinative s'est de plus en plus développée pour ce microbe à mesure que des cultures successives en ont été faites dans des conditions appropriées ; si bien que l'échantillon de MM. Arloing et P. Courmont est devenu de plus en plus sensible à l'action du sérum des tuberculeux.

1. On pourrait leur adjoindre la bactéridie charbonneuse ; M. Malvoz a montré, en effet, que le vaccin charbonneux présentait à la fois une légère mobilité et une sensibilité manifeste aux agglutinines spécifiques sécrétées par le bacille du charbon dans ses cultures. (Ces *Annales*, 25 août 1899.) Il serait intéressant de rechercher si certaines des espèces bactériennes agglutinables regardées comme immobiles n'acquièrent pas dans leurs cultures successives une légère mobilité, laquelle expliquerait leur agglutinabilité ; à ce point de vue, l'étude du bacille de la morve serait peut-être la première à entreprendre, étant donnée la sensibilité de ce microbe aux agglutinines des sérums normaux ou spécifiques.

On croyait autrefois que le bacille typhique présentait, quelle qu'en soit l'origine, une sensibilité à peu près égale à l'action du sérum spécifique. Il est démontré aujourd'hui qu'il n'en est rien; des échantillons nombreux, peu ou pas sensibles à l'action des agglutinines, ont été isolés par divers auteurs de l'organisme des malades atteints de fièvre typhoïde ou des eaux.

Ce sont Kolle, Johnson et Tuggart, Van de Velde, Rodet qui ont fait les premières constatations à cet égard.

M. Sacquépée, en 1901, a isolé trois échantillons de bacilles d'Éberth inagglutinables de la rate de malades morts de la fièvre typhoïde, et trois autres de l'eau. Ces échantillons ont récupéré en trois mois, par simple vieillissement, leur aptitude agglutinative [1].

M. Rémy [2], au moyen de la méthode qu'il préconise, a isolé des eaux des microorganismes semblables; MM. Cambier [3], Emery [4], ont fait des constatations analogues. Les microbes isolés par ces auteurs ont récupéré peu à peu, par des cultures successives, leur agglutinabilité d'abord faible ou absente.

M. Rehns [5] a trouvé, dans une autopsie, un bacille typhique un tiers de fois moins agglutinable que l'échantillon de laboratoire type sur lequel il opérait.

Sur 9 échantillons de bacille d'Éberth isolés par lui du sang des typhiques pendant la vie, M. J. Courmont [6] en a trouvé 8 dont l'aptitude agglutinative lui a paru inférieure d'un quart environ à celle d'un bacille typhique type de son laboratoire.

M. Bancel [7] a trouvé dans trois suppurations d'origine typhique (abcès de la rate, périostite de l'humérus, ostéomyélite du fémur) trois échantillons de bacille d'Éberth primitivement insensibles à l'action du sérum typhique expérimental et à celle du propre sérum des malades; ces échantillons ont récupéré leur aptitude agglutinative après 6 à 11 mois de culture sur les milieux artificiels.

Aucun de ces auteurs n'a donné de renseignements sur la plus ou moins grande mobilité de ces échantillons peu ou point

1. Ces *Annales*, 25 avril 1901.
2. Ces *Annales*, 25 mars 1901.
3. *Revue d'hygiène*, janvier 1902.
4. *Revue d'hygiène*, février 1902.
5. *Soc. de biologie*, 21 décembre 1901.
6. *Journal de physiologie et de pathologie générale*, janvier 1902.
7. *Société médicale des hôpitaux de Lyon*, 14 mars 1902.

agglutinables. Dans certains travaux, publiés sur les analyses d'eaux, il est bien noté quelquefois que les bacilles typhiques isolés par telle ou telle méthode (celles de Peré, de Vincent principalement) sont peu ou pas mobiles ; mais nulle part dans ces travaux, dont la plupart sont d'ailleurs anciens, il n'est fait allusion à un rapport quelconque entre l'immobilité des microbes isolés et la pauvreté ou l'absence de leur aptitude agglutinative [1].

Un seul auteur, M. Sacquépée [2], a, jusqu'à présent, cherché à créer expérimentalement des races de bacille typhique inagglutinables ; il y est parvenu en cultivant pendant 3 mois le bacille d'Éberth dans des sacs de collodion inclus dans la cavité péritonéale de rats fortement immunisés vis-à-vis du bacille typhique. Cet auteur ne nous dit pas si le bacille devenu inagglutinable avait perdu totalement ou partiellement sa mobilité.

Nos études personnelles ont porté sur deux points : nous avons, d'une part, recherché quelle était la sensibilité, vis-à-vis d'un sérum typhique connu, d'échantillons nombreux de bacille d'Eberth isolés par nous de la rate de malades morts de fièvre typhoïde. D'autre part, nous nous sommes attachés à modifier expérimentalement l'aptitude agglutinative d'un bacille typhique extrêmement sensible à l'action des agglutinines.

Dix rates de typhiques ont été étudiées par nous [3]. Les résultats ont été les suivants :

RATE B (enfant). Isolement de 5 *colonies* de bacille typhique. Soumis à l'action d'un sérum expérimental très actif, trois de ces échantillons se montrent d'une sensibilité égale à celle d'un bacille typhique type de laboratoire. Deux sont un peu moins sensibles ; mais la différence est faible, et ne se traduit que par un retard de quelques minutes dans la production des amas.

RATE F (enfant). Isolement de 5 *colonies* de bacille typhique. Examinées

1. Des faits analogues ont été notés également à propos d'échantillons de bacilles d'Éberth isolés du sang des typhiques. TEISSIER (*Archives de méd. exp.* 1895, juillet), COLE (*Johns Hopkins Hosp. reports*, 1901, juillet), BUSQUET (*Revue méd.*, 21 juin 1902), en particulier, ont montré la moindre mobilité des bacilles typhiques isolés dans ces cas.

2. Ces *Annales*, 25 novembre 1901.

3. Dans toutes nos expériences, nous avons opéré sur des cultures en bouillon peptoné de 24 heures. Ces cultures ont été laissées en contact avec le sérum pendant une heure à la température du laboratoire. La recherche de l'agglutination a été faite au bout de ce temps à l'œil nu et au microscope.

comme les précédentes, elles se montrent aussi agglutinables que la culture témoin.

Rate L (enfant). 5 *échantillons* isolés; même résultat.

Dans ce cas comme dans les deux cas précédents, la mobilité des microbes n'avait pas été notée.

Rate P (adulte). 26 *colonies* sont isolées et étudiées. Les bacilles typhiques sont parfaitement mobiles en culture. Avec un sérum expérimental actif à 1/100, l'agglutination se fait pour un bacille typhique de laboratoire en 10 minutes; elle est complète en 25 minutes. Vingt-trois de nos échantillons se comportent de même; trois présentent un retard minime.

Rate M (adulte). 1 *échantillon* de bacille typhique isolé dans ce cas et mobile, examiné dans les mêmes conditions, offre un léger retard dans son agglutination par rapport au bacille typhique témoin. Le sang du malade prélevé dans la période d'état de la maladie est également actif sur ces deux microbes à 1/10; le sang prélevé la veille de la mort se montre actif à 1/10 sur le bacille typhique M et à 1/30 pour le bacille témoin.

Rate C (adulte). 1 *échantillon* isolé se montre d'une sensibilité égale à celle du bacille typhique témoin pour un sérum expérimental actif à 1/100. Il est parfaitement mobile.

Rate J (adulte). 1 *échantillon* est isolé, il est mobile. Même résultat.

Rate P (adulte). 10 *échantillons* sont isolés; mobilité parfaite. Même résultat.

Rate T (adulte). 6 *colonies* isolées de la rate et ensemencées en bouillon ordinaire sont soumises, comparativement à un bacille typhique type, à l'action d'un sérum d'âne actif à 1/5000. Deux des échantillons donnent des amas très petits à 1/1; quatre agglutinent à 1/1, mais pas au-dessus. Le sérum du malade, actif à 1/100 sur le bacille typhique type, agglutine très faiblement à 1/1 quatre de ces échantillons, il se montre sans aucune action sur les deux autres. Ces six échantillons offrent une mobilité nulle ou douteuse.

Des réensemencements de nos cultures, en bouillon ordinaire, pratiqués après 18 et 19 jours, présentent une sensibilité variant de 1/500 à 1/1.000 avec le sérum d'âne actif à 1/5000 pour le bacille typhique témoin. Les cultures primitives elles-mêmes, après 19 jours, présentent une agglutinabilité analogue.

En même temps qu'on ensemençait en bouillon ordinaire aérobie les six colonies isolées de la rate, une *septième colonie* avait été portée directement en bouillon anaérobie. Au bout de 18 jours, cette colonie est repiquée en bouillon ordinaire aérobie; l'agglutinabilité de la culture obtenue est de 1/5000 avec le même sérum d'âne.

Vingt-cinq jours après l'autopsie, un isolement nouveau est pratiqué avec une trace de la pulpe de la rate conservée dans une pipette stérile, les 3 *cultures* obtenues sont agglutinables à 1/1000 avec le même sérum.

L'aptitude agglutinogène, absente ou très faible au début, s'est donc régénérée avec une grande rapidité. En même temps, dans tous les cas, la mobilité a reparu.

Rate D (adulte). 1 *colonie* est isolée de la rate et ensemencée en bouillon

ordinaire; le bacille typhique est très faiblement mobile. Le sérum d'âne actif à 1/5000 sur le bacille témoin agglutine cette culture à 1/10 seulement. Une culture fille de cette culture, pratiquée le jour même, est agglutinable à 1/100 par le même sérum.

Quatre jours après l'autopsie, un nouvel isolement est fait avec une trace de la pulpe de rate conservée dans une pipette stérile; les colonies isolées dont agglutinables à 1 1000 par le même sérum d'âne ; elles sont mobiles. Comme dans le cas précédent, l'aptitude agglutinative et la mobilité, d'abord absentes, sont réapparues rapidement.

D'une manière générale, ces expériences confirment les données des auteurs. Le bacille typhique, isolé récemment de la rate de l'homme, se montre le plus souvent parfaitement sensible à l'action du sérum spécifique; mais dans un certain nombre de cas, cette sensibilité est ou très affaiblie ou nulle.

Elle se régénère rapidement dans les cultures successives; quelquefois même sa réapparition est subite dès la première culture, peu agglutinable à la seconde, très sensible à l'action des agglutinines.

Toutes les fois que notre attention a été attirée de ce côté, nous avons remarqué la parfaite mobilité des bacilles typhiques agglutinables et la mobilité nulle ou douteuse des bacilles inagglutinables. Lorsque ceux-ci récupèrent leur aptitude agglutinative, la mobilité reparaît en même temps.

Nous avons cherché, d'autre part, à modifier expérimentalement l'agglutinabilité d'un échantillon de bacille typhique parfaitement sensible à l'action du sérum spécifique dans le but de créer une race de bacilles d'Eberth dépourvue de l'aptitude agglutinative.

Le passage par l'organisme d'animaux sensibles (cobayes, Lapins) ne nous a donné aucun résultat. Les bacilles typhiques isolés du sang des animaux inoculés se sont montrés, même après un grand nombre de passages, aussi sensibles à l'action d'un sérum étalon qu'au début de nos expériences.

Dans un cas cependant, la perte de la propriété agglutinable s'est produite. Ce cas mérite d'être relaté.

Un cobaye est inoculé, le 25 février 1901, dans la plèvre avec 1/4 de c. c. d'une culture de bacille typhique, âgée de 7 jours, en bouillon spécial servant à l'un de nous pour la préparation de la toxine soluble du microbe. Cette culture est mobile et très agglutinable. Le cobaye meurt le 2 mars. A l'autopsie, on ne trouve aucune lésion pleurale, la rate et les capsules surré-

nales sont un peu grosses, l'intestin est normal, les poumons congestionnés. La vésicule biliaire, très distendue, contient un liquide purulent. Les tubes de culture ensemencés avec le sang demeurent stériles. Une trace du pus de la vésicule portée sur gélose donne lieu au développement de colonies de bacilles d'Eberth. Trois de ces colonies sont ensemencées en bouillon; les cultures obtenues ne s'agglutinent qu'au bout de plusieurs heures à 1/10 sous l'action d'un sérum typhique expérimental actif à 1/2000. Les bacilles typhiques n'offrent qu'une mobilité douteuse.

Ces trois cultures mises en pipettes sont réensemencées en bouillon après 10 mois. Les cultures filles ont récupéré leur aptitude agglutinative; un sérum typhique expérimental actif à 1/1500 sur un bacille typhique type, les agglutine à 1/500 environ. La mobilité est parfaite.

Le vieillissement ne nous a pas donné de résultats appréciables. Nous avons examiné quelle était l'agglutinabilité de sept échantillons de bacilles typhiques légitimes et bien agglutinables ayant séjourné en pipettes pendant quatre ans. Les cultures filles obtenues, avec les réensemencements en bouillon de ces sept échantillons, se sont montrées sensiblement aussi agglutinables, par l'action d'un sérum expérimental, qu'une culture étalon ; dans un seul cas, il y a eu un retard manifeste dans l'agglutination

Ls procédé qui nous a permis d'obtenir le plus facilement un amoindrissement de l'aptitude agglutinante est la culture à 42°. A cette température, le bacille typhique se développe en bouillon ordinaire en donnant un trouble léger; il ne pousse ni sur les milieux solides, ni en solution de peptone (d'une façon appréciable tout au moins). Si la température s'élève un peu au-dessus de 42°, il n'y a pas de développement apparent. La vitalité du microbe à l'étuve à cette température est courte ; au bout de 3 à 4 jours généralement, les réensemencements deviennent stériles. Il faut donc repiquer les cultures tous les jours, ou tout au moins tous les deux jours.

Nous avons cultivé à la température de 42°, 2 échantillons de bacilles typhiques légitimes bien agglutinables et mobiles, d'origines différentes. Les résultats obtenus ont été sensiblement les mêmes.

Échantillon n° 1. — L'échantillon n° 1, examiné au début de l'expérience avec un sérum étalon, est agglutiné à 1/1000 par ce sérum. Au 15e passage à 42°, il n'est plus agglutinable qu'à 1/10 et très faiblement, sa mobilité est douteuse. (Une culture fille de cette culture du 15e passage à 42°, mise à

l'étuve à 36°, s'agglutine à 1/30 sous l'action du même sérum.) L'étuve ayant baissé aux environs de 40° pendant 48 heures, l'agglutinabilité s'est en partie récupérée aux 18e et 19e passages (à ce dernier passage, le même sérum donne une agglutination à 1/100); elle s'est ensuite atténuée à nouveau, l'étuve ayant été maintenue à 42°, mais sans disparaître complètement. Au 54e passage (le dernier pratiqué), un sérum actif à 1/3000 pour le bacille typhique étalon donne avec cette culture des amas petits à 1/5, de très petits amas à 1/10, rien au-dessus; la mobilité est nulle ou douteuse.

Échantillon nº 2. — L'échantillon nº 2 a été isolé de la vésicule biliaire d'un cobaye mort de septicémie éberthienne expérimentale; il est d'une agglutinabilité parfaite. Le sérum étalon agit sur lui à 1/3000. Au 1er passage à 42°, l'agglutinabilité est déjà tombée à 1/100; au 2e passage à 1/10 environ; il n'est plus ou presque plus mobile. L'agglutinabilité ne s'est pas modifiée ultérieurement jusqu'au 23e passage à 42° (le dernier pratiqué); des mensurations faites de temps en temps ont montré des écarts variant de 1/5 à 1/20 sous l'action du même sérum étalon — ces variations doivent être attribuées à des oscillations légères de la température de l'étuve.

Au même jour, nous arrêtons les passages à 42° de ces 2 échantillons à peu près également inagglutinables, et nous en faisons des cultures successives en bouillon ordinaire à 36° (repiquage pratiqué chaque jour).

Au 1er passage à 36°, le sérum étalon (actif à 1/3000) agglutine l'échantillon 1 à 1/200, l'échantillon 2 à 1/100; la mobilité est déjà réapparue dans les deux cultures.

Au 2e passage, le taux de l'agglutinabilité est de 1/1000 pour l'échantillon 1, de 1/500 pour l'échantillon 2.

Au 3e passage, résultat sensiblement égal.

Au 5e passage, l'échantillon 1 s'agglutine à 1/2000 environ, l'échantillon 2 à 1/700. Il est à noter que la culture en bouillon de l'échantillon 2 s'est montrée, à tous les passages, à peu près deux fois moins abondante que la culture de l'échantillon 1, ce qui indique un retour à peu près égal de la sensibilité à l'agglutinine pour les deux échantillons.

Au 5e passage, la mobilité des deux cultures est parfaite. — Nous n'avons pas poussé plus loin nos recherches.

Ces expériences montrent qu'il est très facile d'atténuer à l'extrême l'aptitude agglutinative du bacille typhique en faisant les cultures de ce microbe à 42°. A cette température, l'agglutinabilité baisse très rapidement; après quelques passages, elle est tout à fait amoindrie. Elle ne disparaît cependant pas entièrement, et il suffit de quelques cultures en série à 36° pour la restituer presque complètement. La mobilité du microbe disparaît ou reparaît en même temps.

Si intéressants que fussent ces résultats, ils ne nous donnaient

pas entière satisfaction. Le but de nos recherches était de trouver une race de bacille typhique définitivement privée de l'aptitude agglutinative, sur lequelle nous puissions expérimenter à notre aise et rechercher, par comparaison avec une race de même origine, mais bien agglutinable, les rapports existant entre l'aptitude agglutinative, la fonction agglutinogène et la mobilité. Nos isolements de bacilles typhiques de la rate, comme nos tentatives de création de races inagglutinables, ne nous avaient donné que des échantillons temporairement privés (et jamais d'une façon absolument complète) de la sensibilité aux agglutinines. Il nous était impossible d'expérimenter sur elles puisque, du jour au lendemain, l'aptitude agglutinative très atténuée pouvait être récupérée presque totalement.

Nos recherches se trouvaient donc arrêtées, lorsque le hasard mit entre nos mains l'échantillon microbien que nous avions cherché sans succès à créer.

Cet échantillon n'est pas, ainsi que nous l'avons cru pendant un certain temps, une race particulière du bacille typhique, mais un microbe pathogène très voisin. Nous lui conserverons ici le nom que nous lui avons primitivement donné de *bacille T C*.

Il nous paraît intéressant de rapporter ici brièvement l'histoire de ce microbe.

Depuis plus d'un an, l'un de nous pratiquait alternativement des passages d'un bacille typhique, légitime, mobile et bien agglutinable, par l'organisme animal et par des milieux de culture spéciaux destinés à la production de la toxine soluble du bacille d'Éberth. Un cobaye inoculé dans la plèvre avec 6 gouttes d'une de ces cultures âgée de 4 jours meurt en 9 jours; à son autopsie, nous trouvons la vésicule biliaire distendue par un liquide purulent, comme dans le cas du cobaye atteint de cholécystite typhique relaté plus haut[1]. — Un isolement est pratiqué de suite avec ce ce pus sur gélose et nous donne deux colonies, qui, repiquées en bouillon, se montrent à la fois immobiles et inagglutinables à 1/2 par l'action d'un sérum typhique expérimental actif à 1/10.000. Au point de vue morphologique, comme au point de vue des caractères de culture, le microbe isolé est identique au bacille typhique. Son immobilité et son inagglutinabilité persistent dans les cultures successives faites à une température de 25°, puis de 36° (les repiquages étant pratiqués d'abord tous les jours, ensuite tous les deux jours). A cette température, les cultures en bouillon sont peu abondantes;

1. On se rappelle que dans ce cas nous avions isolé un bacille typhique très peu agglutinable.

elles le sont devenues un peu plus dans la suite, mais sans atteindre jamais l'abondance de cultures typhiques ordinaires. Nous pensions alors avoir en notre possession un échantillon de bacille typhique inagglutinable et nous cherchâmes à la fois à conserver ce caractère à certaines cultures et à développer chez d'autres l'aptitude agglutinative absente jusque-là. Nous sommes parvenus facilement à ce double résultat en faisant des cultures à des températures différentes. Conservé et repiqué à 25°-35°, notre microbe est resté jusqu'à présent ce qu'il était primitivement, c'est-à-dire immobile et insensible à l'action du sérum spécifique (nous verrons plus loin comment nous sommes arrivés à préparer ce sérum). Au contraire, cultivé et repiqué à une température de 18° à 20°, il ne tarda pas à présenter une mobilité d'abord faible, puis de plus en plus nette, en même temps qu'une sensibilité de plus en plus grande à l'action du sérum spécifique.

La première culture à 20°, venant d'une des cultures primitives, conservée en pipette depuis 2 mois, était encore immobile. — La seconde culture présentait déjà une mobilité très faible — Pensant que nous avions affaire à un échantillon de bacille typhique, nous fîmes agir sur elle un sérum typhique expérimental actif à 1/300 ; ce sérum donna quelques amas à 1/1, rien au-dessus. Le même sérum, essayé plus tard, à plusieurs reprises, sur des cultures de passage à 20°, de plus en plus mobiles et finalement d'une mobilité parfaite ne se montra pas sensiblement plus actif vis-à-vis d'elles. Ce résultat, en complet désaccord avec nos expériences antérieures, nous amena alors à penser que notre microbe, malgré sa grande analogie avec lui et malgré son origine, n'était pas le bacille typhique. La preuve nous en fut donnée rapidement par l'expérience suivante : un lapin inoculé avec une culture de ce microbe mobile fournit un sérum agglutinant pour ce microbe dans sa forme mobile, inactif sur ce même microbe dans sa forme immobile et aussi sur le bacille typhique [1].

A la suite de ces expériences, nous nous sommes donc trouvés avoir entre nos mains deux variétés différentes d'un même microbe, provenant toutes les deux de la même culture originelle et conservant, dans des conditions de culture différentes, leurs caractères spéciaux :

Une première variété immobile, inagglutinable par l'action du sérum spécifique, produit par l'inoculation aux animaux de cultures vivantes de la variété mobile. (Nous verrons plus loin

1. Les caractères de ce microbe se sont peu à peu modifiés par les cultures successives. Immédiatement après son isolement, il présentait les caractères de culture du bacille typhique, en particulier le faible développement en gélatine et sur pomme de terre, l'absence de production d'indol et d'action sur le lactose. Après une cinquantaine de passages, le développement sur pomme de terre et en gélatine est devenu plus abondant, et le microbe a commencé à donner de l'indol. Cette réaction peu nette pour les cultures faites à 35° est évidente pour celles à 18°-20°.

La virulence (voir plus loin) ne s'est pas modifiée par les cultures successives.

que cette variété inagglutinable est également inagglutinogène.)

Une seconde variété mobile, sensible à l'action du sérum spécifique; représentant probablement le microbe sous sa forme ancestrale, l'immobilité n'étant, suivant toute apparence, qu'un caractère de dégradation dû au passage par l'organisme animal.

La possibilité de conserver indéfiniment à ces deux variétés leurs caractères différentiels, en les cultivant aux températures respectives de 18 à 20° et de 25 à 35°, nous a permis non seulement de nous rendre compte, d'une façon encore plus manifeste, que dans nos expériences antérieures, des relations qui existent entre l'aptitude agglutinative d'un microbe et sa mobilité, mais encore de saisir les rapports intimes qui relient pour un même microbe la fonction agglutinogène à l'aptitude agglutinative [1].

Afin d'éviter des redites, nous donnerons le détail des expériences relatives à l'action du sérum spécifique de notre microbe sur ses cultures mobiles et agglutinables dans un prochain chapitre qui aura trait, précisément, aux rapports existant entre la fonction agglutinogène des microbes et leur aptitude agglutinative.



VARIABILITÉ DE LA FONCTION AGGLUTINOGÈNE CHEZ LES DIFFÉRENTES ESPÈCES MICROBIENNES; CHEZ LES ÉCHANTILLONS D'UNE MÊME ESPÈCE; CHEZ UN MÊME MICROBE DANS LES DIVERSES CONDITIONS DE SA VIE. — RAPPORTS DE CES VARIATIONS AVEC LA MOBILITÉ DES MICROBES. — RAPPORTS DE L'APTITUDE AGGLUTINATIVE AVEC LA FONCTION AGGLUTINOGÈNE.

Nous savons, par ce qui précède, qu'il existe, dans la série des espèces microbiennes comme pour une même espèce, un rapport frappant entre la mobilité d'un microbe et son aptitude agglutinative. Immobiles, certains microbes peuvent être agglutinés par l'action des sérums spécifiques, mais cette action est

1. L'immobilité chez ce microbe ne paraît pouvoir être conservée qu'à la condition d'élever progressivement la température de culture. Au début, le bacille T C se montrait immobile à 25°; nous avons dû pour éviter le retour de la mobilité faire au bout d'un certain nombre de passages les cultures à 28°, 30°, puis 35°. A cette température le microbe est encore immobile; il est probable qu'il y reprendra plus tard sa mobilité. — Nous ne serons donc très probablement parvenu, en fin de compte, qu'à retarder le retour de cette mobilité; mais ce retard a été suffisant pour permettre nos expériences.

toujours peu prononcée ; elle se montre au contraire intense, proportionnelle seulement au degré d'activité du sérum, lorsque la mobilité du microbe est parfaite.

Nous allons retrouver à propos de la fonction agglutinogène des faits semblables. Nous nous rendrons compte, de plus, des relations étroites qui lient l'une à l'autre l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène.

Variabilité de la fonction agglutinogène chez les différentes espèces microbiennes. Ses rapports avec la mobilité des microbes et leur aptitude agglutinative. — Nous pourrions répéter à peu de chose près dans ce chapitre ce que nous avons dit plus haut à propos des variations de l'aptitude agglutinative. — Ce sont les mêmes espèces microbiennes qui se montrent parallèlement mobiles, bien agglutinables et agglutinogènes ou, d'autre part, peu ou pas mobiles, peu ou pas agglutinables, peu ou pas agglutinogènes.

Quelques exemples suffiront à le démontrer. Les microbes les plus aptes à déterminer, dans les humeurs des animaux inoculés, l'apparition d'un pouvoir agglutinant intense sont, d'après les travaux des auteurs (confirmés pour la plupart de ces microbes par nos expériences personnelles), le bacille typhique, les différentes races du *B. coli*, les espèces voisines de ces deux microbes, le bacille de la psittacose, le pyocyanique, les vibrions cholériques et cholériformes, le b. cyanogène (ce dernier microbe d'après nos expériences), etc. Tous ces microbes sont doués d'une mobilité extrême; ils sont, nous l'avons vu, très sensibles à l'action des agglutinines. — La propriété agglutinante ne se montre pas seulement, pour cette catégorie de microbes, dans les humeurs des animaux inoculés expérimentalement; elle existe aussi, d'une façon presque constante, dans le sang de l'homme ou des animaux infectés spontanément par ces bactéries.

Parmi les microbes doués d'une propriété agglutinogène faible, nous trouvons le bacille de la tuberculose, le bacille de Nicolaïer, le vibrion septique, le *B. Chauvœi;* les microbes de la diphtérie, de la morve, de la peste, etc. L'inoculation des cultures de ces microbes ou des produits de leur activité aux animaux détermine généralement dans leurs humeurs l'apparition de propriétés agglutinantes plus ou moins manifestes, mais dont l'activité n'atteint jamais celles des aggluti-

nines produites par les microbes de la catégorie précédente.

Les humeurs de l'homme ou des animaux, infectés spontanément par ces microbes, ne présentent pas d'une façon constante la réaction agglutinante spécifique; lorsque celle-ci existe, elle est toujours peu intense. Pour ne citer qu'un exemple, le sang des malades atteints de la diphtérie ou du tétanos ne possède aucun pouvoir agglutinant vis-à-vis des bacilles de Nicolaïer et de Lœffler; il faut, pour agglutiner ces microbes, recourir à l'emploi de sérums antitoxiques très actifs.

Les microbes de cette seconde catégorie sont ou bien immobiles, ou bien doués d'une mobilité très faible, souvent temporaire; ils possèdent, nous l'avons vu, une aptitude agglutinative peu développée.

Une troisième catégorie de microbes est celle des microbes inagglutinogènes : bacille de l'influenza, bactéries encapsulées dont le bacille de Friedlander est le type, méningocoque, etc. Ces bactéries sont immobiles et inagglutinables [1].

Variabilité de la fonction agglutinogène chez un même microbe dans les différentes conditions de sa vie. Rapports de ces variations avec la mobilité du microbe et son aptitude agglutinative [2]. — L'étude des variations du pouvoir agglutinogène chez une même espèce microbienne dans les différentes conditions de sa vie n'a été jusqu'à présent qu'ébauchée. Les rares travaux où il y est fait allusion ont trait au bacille typhique.

Plusieurs auteurs, M. Rémy en particulier [3], conseillent, lorsqu'on a isolé des eaux un microbe semblable au bacille typhique, mais inagglutinable, de l'inoculer aux animaux et de

1. Rappelons encore une fois que les termes *inagglutinable*, *inagglutinogène* ne doivent pas être pris dans un sens absolu.

Il est possible (et nous le croyons pour notre part) que les microbes dits inagglutinables puissent être agglutinés, à un degré probablement très faible, par un sérum extraordinairement actif, employé à doses considérables par rapport à la quantité de culture mise en expérience.

Nous avons cependant conservé les termes déjà usités de microbes inagglutinables et inagglutinogènes, parce qu'ils sont simples, commodes, et que, pratiquement au moins, ils traduisent un fait exact.

2. Nous avons dit, à propos de l'étude des variations de l'aptitude agglutinative des différentes races d'une même espèce microbienne, qu'il n'était pas prouvé qu'il existât des races chez lesquelles la propriété agglutinative normale dans l'espèce fût définitivement perdue; et qu'il s'agissait plutôt, à notre avis, dans ce cas, d'échantillons ayant perdu temporairement leur agglutinabilité. La même remarque nous paraît s'imposer en ce qui concerne l'existence de races inagglutinogènes d'un microbe normalement agglutinogène.

3. Ces *Annales*, 25 novembre 1900.

rechercher au bout de quelques jours si le sérum de ceux-ci devient actif vis-à-vis d'un échantillon de bacille typhique légitime. Lorsque ce sérum présente un pouvoir agglutinant de 1/40, le microbe doit être considéré comme un bacille typhique véritable. Ces auteurs admettent donc qu'il peut y avoir, jusqu'à un certain point, dissociation entre les propriétés agglutinative et agglutinogène du bacille d'Éberth.

Tel n'est pas l'avis de M. Rehns[1]. Cet auteur, ayant isolé d'une rate de typhique un échantillon de bacille d'Éberth peu agglutinable et l'ayant inoculé à des animaux d'expérience, vit que le sérum de ceux-ci se montrait sensiblement moins actif, vis-à-vis d'un bacille typhique légitime, que le sérum d'animaux ayant reçu une dose égale de culture d'un bacille d'Éberth de laboratoire. M. Rehns a fait ses expériences avec des cultures stérilisées par la chaleur.

M. Rodet[2] a combattu ces conclusions. Pour cet auteur, il n'existerait aucun rapport entre l'aptitude agglutinative d'un microbe et son pouvoir agglutinogène. Les expériences de M. Rodet ont porté sur le bacille typhique et sur le *B. coli*.

Nos expériences personnelles nous ont conduit à une conclusion diamétralement opposée.

Nous avons opéré d'une part avec le bacille typhique, d'autre part avec le bacille TC, isolé par nous d'une cholécystite suppurée d'un cobaye. (Voir plus haut.)

1° *Expériences pratiquées avec le bacille typhique.* — Les échantillons de bacilles d'Éberth, spontanément inagglutinables et peu mobiles, isolés par nous de la rate d'individus morts de fièvre typhoïde se prêtaient mal aux recherches, puisque, d'une culture à l'autre, ils récupéraient quelquefois leur agglutinabilité et leurs mouvements. Les expériences que nous avons pratiquées avec eux ne nous ont amenés à aucune conclusion; aussi jugeons-nous inutile de les rapporter.

Nous avons fait, par contre, un certain nombre d'expériences intéressantes avec nos cultures de bacille typhique à 42°. A cette température, nous l'avons montré, au bout de quelques passages le bacille d'Éberth devient peu mobile et peu aggluti-

1. *Société de biologie*, 21 décembre 1901.
2. *Société de biologie*, 15 février 1902.

nable. Reporté en bouillon à 36°, il récupère rapidement sa mobilité et son agglutinabilité normales.

Voici quelques-unes de nos expériences [1] :

Lapin 82. — Ce lapin reçoit dans les veines, le 26 avril, un demi-centimètre cube d'une culture de bacille typhique à 42°. (Cette culture appartient au 2e passage à 42° du second échantillon dont il a été question dans le chapitre précédent.) La culture inoculée est très peu mobile; un sérum expérimental actif à 1/2000 sur le même échantillon cultivé à 36° n'agglutine la culture, faite à 42°, qu'à 1/5. Le sérum normal de ce lapin est sans action sur le bacille typhique à 36°.

Le 1er mai (6e jour), le sérum est actif à 1/3 seulement sur le bacille typhique à 36°; le 6 mai (12e jour), à 1/30; le 13 mai (19e jour), à 1/1000.

Lapin 83. — Le pouvoir agglutinant normal du sérum de ce lapin est de 1/1 sur le bacille typhique à 36°. Inoculation le 30 avril, dans les veines, de 1 c. c. d'une culture du même échantillon faite à 42° (5e passage à cette température); cette culture est très peu mobile, elle est agglutinable à 1/1 seulement par le sérum étalon actif à 1/2000 sur la culture à 36°. Le 6 mai (6e jour), le pouvoir agglutinant du sérum du lapin sur le bacille typhique à 36° est de 1/5 au maximum; le 12 mai (12e jour), il est de 1/40 environ; le 18 mai (18e jour), de 1/75.

Lapin 55. — Le pouvoir agglutinant normal du sérum de ce lapin est nul à 1/1 sur le bacille typhique à 36°. Inoculation le 22 mai, dans les veines, de 3/4 de c. c. d'une culture représentant le 12e passage du même échantillon à 42°. Cette culture est d'une mobilité douteuse; un sérum étalon actif à 1/1000 sur le bacille typhique à 36° ne donne pas avec elle d'amas nets à 1/1. Le 28 mai (6e jour), le pouvoir agglutinant du sérum du lapin sur le bacille typhique à 36° est de 1/10 environ; le 3 juin (12e jour), il est de 1/40; le 9 juin (18e jour), de 1/20 à peine.

Lapin 18 (Témoin). — Pouvoir agglutinant normal nul. Ce lapin reçoit dans les veines le 8 janvier, 1/2 c. c. d'une culture du même échantillon (mobile, agglutinable) à 36°. Le 15 janvier (6e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est de 1/25 sur ce microbe et sur un autre échantillon de bacille typhique de laboratoire; le 21 janvier (12e jour), il est de 1/1000 sur lui-même (un peu plus faible pour l'autre échantillon); le 4 février (18e jour), de 1/3000 sur les deux échantillons.

Ces expériences montrent que le bacille typhique rendu peu agglutinable et presque immobile par des passages successifs à 42° perd également en grande partie son pouvoir agglutinogène;

1. Toutes nos expériences ont été faites avec ou sur des cultures en bouillon présentant rigoureusement un trouble identique. Nous avons pris pour type, afin d'avoir des résultats comparables, une culture de notre bacille TC de 24 heures à 18°. Cette culture est à peu près moitié moins abondante qu'une culture de bacille typhique ordinaire de 24 heures à 35°. Tous les chiffres cités, en particulier ceux représentant le pouvoir des divers sérums (sérums étalons, sérums des expériences) se rapportent à des cultures présentant un trouble égal.

2° *Expériences pratiquées avec le bacille TC.* — Nous rappelons que ce microbe, isolé par nous d'une suppuration de la vésicule biliaire d'un cobaye inoculé avec une culture de bacille typhique, n'est pas le bacille d'Eberth, mais qu'il appartient à une espèce voisine. Cultivé à 25°-35°, il conserve les caractères qu'il avait au moment de son isolement, il est immobile, inagglutinable. Mis à l'étuve à 18°-20°, il est devenu peu à peu mobile[1] et a recouvré en même temps son aptitude agglutinative.

La virulence de ce microbe est très grande et sensiblement égale, quelle que soit la température à laquelle il s'est développé. Sur une douzaine d'animaux inoculés avec des cultures vivantes de ce microbe, plus de la moitié sont morts, un certain nombre même avant d'avoir pu être utilisés pour nos expériences.

L'inoculation des cultures de ce microbe au lapin détermine, dans les jours qui suivent, une altération très manifeste du sang, lequel devient poisseux et se coagule très rapidement. Ce phénomène a son maximum vers le 6e jour; il a généralement disparu au 12e. Nous avons remarqué une altération identique du sang chez les lapins inoculés avec des cultures de bacille typhique, de *B. coli* et du bacille de la psittacose.

Les expériences que nous avons pratiquées avec le bacille TC, dans ses deux formes nous ont montré de la façon la plus nette les relations intimes qui existent entre l'agglutinabilité, la fonction agglutinogène et la mobilité d'un microbe. Ces résultats peuvent être résumés dans les trois propositions qui vont suivre, et que justifient les expériences citées à l'appui de chacune d'elles.

Le bacille TC, dans sa forme immobile et inagglutinable, est inagglutinogène pour lui-même.

Nous avons opéré sur deux échantillons provenant de deux colonies isolées du pus de la vésicule biliaire et ayant tous deux conservé également, en cultures à 25°-35°, leur inagglutinabilité et leur immobilité primitives.

Lapin 27. — Poids : 1,500 grammes. Le sérum de ce lapin est sans action à 1/1 sur les deux échantillons de TC immobile, comme d'ailleurs sur deux races de bacilles typhiques types. L'animal reçoit le 11 janvier 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC (1er échantillon) sous la peau. Le 17 janvier (6e jour), son sérum est sans action sur les quatre microbes cités

1. Il nous a été jusqu'à présent impossible de colorer par les méthodes classiques les cils de ce microbe; un échantillon de bacille typhique pris comme témoin dans nos expériences montrait des cils parfaitement colorés.

plus haut; le 23 janvier (12e jour), même résultat; le 7 février (18e jour), même résultat.

Lapin 97. — Poids : 2,480 grammes. Son sérum est sans action, à 1/1, sur les deux échantillons de TC immobile et sur deux races de bacille typhique type. Cet animal reçoit le 17 janvier 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC immobile (2e échantillon) sous la peau. Le 23 janvier (6e jour), son sérum est sans action sur les deux cultures de bacille typhique et sur les échantillons de TC immobile; le 30 janvier (12e jour), même résultat pour les deux TC immobiles, très légers amas à 1/1 avec les deux échantillons de bacille typhique ; le 13 février (18e jour), résultat identique au précédent.

Le sérum des animaux inoculés parallèlement avec deux cultures différentes de bacilles typhiques légitimes s'est montré sans action sur les deux échantillons de TC immobile, ainsi que le montrent les expériences suivantes :

Lapin 25. — Reçoit la même dose d'une culture de bacille typhique légitime. Au 6e jour, le sérum agit à 1/50 sur les deux échantillons de bacille typhique; le 12e jour à 1/200; le 18e jour à 1/5000. Aucune action les 6e, 12e et 18e jours sur les deux échantillons de TC immobile.

Lapin 18. — Inoculé avec 1 c. c. de culture de bacille d'Éberth. (Voir plus haut son action sur le bacille typhique). Aux 6e, 12e et 18e jours, il est inactif pour les deux échantillons de TC immobile.

Le bacille TC, dans sa forme mobile (et agglutinable), est agglutinogène pour lui-même, mais non pour sa forme immobile.

Nous rappelons encore une fois que par des passages successifs à 18°-20°, la culture de TC primitivement immobile (et le restant à 25°-35°), a acquis peu à peu une mobilité très nette. En même temps que cette mobilité, l'aptitude agglutinable et la fonction agglutinogène se sont développées.

Expériences faites avec cette forme mobile de TC :

Lapin 90. — Poids : 1,560 grammes. Le sérum de ce lapin agglutine très légèrement à 1/1 l'échantillon TC dans sa forme mobile ; il est sans action sur un bacille typhique de laboratoire. Ce lapin reçoit sous la peau, le 7 mai, 1 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC mobile. Le 14 mai (7e jour), son sérum est actif à 1/100 sur TC mobile, à 1/1 sur 2 échantillons de TC immobile, à 1/20 sur un échantillon de bacille typhique légitime [1]. Le 20 mai (13e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est de

1. L'apparition dans le sérum d'un animal inoculé avec une culture microbienne d'un pouvoir agglutinant manifeste vis-à-vis d'un microbe d'une espèce étrangère et mobile (le bacille typhique dans le cas particulier) est un fait intéressant et qui mérite d'être signalé. Sans être constant, il n'est pas exceptionnel ; plusieurs de nos expériences le montrent. Ce pouvoir agglutinant apparaît généralement vers le 4e ou 6e jour après l'inoculation ; il a son maximum vers le 10e jour, il baisse

1/800 pour TC mobile, de 1/1 pour un échantillon de TC immobile (échantillon correspondant) et de 0 pour l'autre; deux cultures différentes de bacille typhique sont agglutinées à 1/20. Le 29 mai (21e jour), le pouvoir agglutinant est de 1/1500 pour TC mobile, de 1/1 et de 0 pour les deux échantillons de TC immobile; il est de 1/10 à 1/20 pour les deux cultures de bacille typhique, de 1/1 pour le bacille de la psittacose (mobile), de 1/5 pour un bacille éberthiforme de H. Durham (mobile), de 1/5 pour un échantillon de *B. coli*.

Lapin 98. — Poids : 1,330 grammes. Le sérum de ce lapin agglutine incomplètement à 1/1 un échantillon de bacille typhique légitime; il donne des amas à 1/10 avec TC mobile. Ce lapin reçoit sous la peau, le 17 mai, 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC mobile. Le 23 mai (6e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est de 1/1 pour le bacille typhique, de 1/10 pour TC mobile. Le 29 mai (12e jour), le sérum agglutine TC mobile à 1/300; il agglutine incomplètement à 1/1 les deux échantillons de TC immobile; le bacille typhique est agglutiné à 1/5. Le 4 juin (18e jour), le pouvoir agglutinant est de 1/300 pour TC mobile, de 1/1 à 1/5 pour deux échantillons de bacille typhique; de 1/1 à peine pour un échantillon de *B. coli*, de 1/5 pour le bacille éberthiforme de H. Durham, de 1/1 pour le bacille de la psittacose.

Le bacille TC, dans sa forme immobile et inagglutinable, est inagglutinogène non seulement pour lui-même, mais encore pour sa forme mobile et agglutinable.

Les expériences suivantes le démontrent :

Lapin 71. — Poids : 1,365 grammes. Le sérum de ce lapin est inactif à 1/1 sur TC dans ses deux formes mobile et immobile; il donne à ce taux de très petits amas avec une culture d'un bacille typhique type. Ce lapin reçoit sous la peau, le 6 juin, 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC immobile (56e passage à 25°-35°). Le 12 juin (6e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est nul à 1/1 pour TC mobile et immobile et pour le bacille typhique. Le 18 juin (12e jour), le sérum agglutine le bacille typhique à 1/1, il est sans action sur TC immobile et donne de très petits amas à 1/1 avec TC mobile. Le 24 juin (18e jour), le pouvoir agglutinant est de 1/1 pour le bacille typhique et TC mobile, il est nul pour TC immobile.

Lapin 87. — Poids : 830 grammes. Le sérum de ce lapin est inactif à 1/1 sur les deux formes mobile et immobile de TC et sur le bacille typhique. Ce lapin reçoit sous la peau, le 7 juin, 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC immobile (57e passage à 25°-35°). Le 13 juin (6e jour), le

ensuite pour disparaître au bout de 20 à 30 jours. Le pouvoir agglutinant n'est jamais bien élevé; il a atteint cependant dans un cas 1/40. (Voir lapin 87.)

Il n'est donc pas possible de considérer comme bacille typhique légitime, ainsi que le fait Rémy, un microbe inagglutinable dont l'inoculation aux animaux d'expérience détermine dans leurs humeurs l'apparition d'un léger pouvoir agglutinant vis-à-vis du bacille typhique.

pouvoir agglutinant du sérum est nul à 1/1 pour TC mobile et immobile, il est de 1/40 environ pour le bacille typhique [1]. Le 19 juin (12e jour), le sérum agglutine le bacille typhique à 1/20, il est sans action à 1/1 pour TC immobile, il agit d'une façon très incomplète au même taux sur TC mobile. Le 25 juin (18e jour), le pouvoir agglutinant est de 1/10 pour le bacille typhique, il est nul pour TC immobile et de 1/5 au plus pour TC mobile.

Lapin 55. — Poids : 1,420 grammes. Le sérum de ce lapin est inactif à 1/1 pour le bacille typhique et pour TC immobile, il donne des amas très petits à 1/1 avec TC mobile. Ce lapin reçoit sous la peau, le 8 juin, 1/3 de c.c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC immobile (58e passage à 25°-30°). Le 14 juin (6e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est nul à 1/1 pour TC mobile et immobile et pour le bacille typhique; le 20 juin (12e jour), même résultat pour TC immobile et pour le bacille typhique; TC mobile est agglutiné à 1/1. Le 26 juin (18e jour), le sérum est inactif à 1/1 pour les trois microbes.

Ces expériences portent en elles-mêmes leurs conclusions.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET DÉDUCTIONS PRATIQUES

Il résulte des faits que nous venons d'exposer que l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène, propriétés probablement inhérentes à toutes les cellules libres, en particulier aux microbes, offrent les variations les plus grandes, soit qu'on les considère dans la série des êtres unicellulaires, soit qu'on les étudie chez certaines espèces microbiennes, dans des conditions différentes de leur vie.

Ces variations sont telles qu'on serait en droit de diviser pratiquement les microbes en espèces ou races agglutinables et inagglutinables et en espèces ou races agglutinogènes et inagglutinogènes. En ce qui concerne spécialement le bacille typhique, le plus intéressant et le mieux étudié de ces microbes au point de vue expérimental, la division de ses échantillons divers en agglutinables et inagglutinables s'est déjà complètement imposée aux auteurs.

Agglutinabilité et pouvoir agglutinogène sont des propriétés parallèles, indissociables chez un même microbe; nos expériences le montrent de la façon la plus nette. Aussi croyons-nous que l'on peut avancer que tout microbe agglutinable est en même temps agglutinogène et que tout microbe inagglutinable est inagglutinogène.

1. Voir la note précédente.

Bien que la mobilité ne soit pas une condition absolue de l'existence des propriétés agglutinative et agglutinogène chez les microbes, il semble démontré qu'elle joue un rôle indéniable, au point de vue de l'importance de ces fonctions. Seuls les microbes mobiles sont doués d'une sensibilité véritable à l'action des agglutinines, seuls ils sont nettement agglutinogènes; les microbes dépourvus de mobilité sont peu ou pas agglutinables, peu ou pas agglutinogènes. La mobilité des microbes tenant à la présence de cils à leur surface, il paraît légitime de penser que c'est la tunique ciliée de ces êtres qui joue le rôle capital dans le phénomène de l'agglutination [1]. Les microbes mobiles doivent l'importance de leurs propriétés agglutinative et agglutinogène au développement de cette tunique ciliée. Les microbes immobiles, chez lesquels cette tunique est rudimentaire et se réduit sans doute à un simple revêtement, ne possèdent ces propriétés qu'à un degré infiniment plus faible. Aucun microbe cependant ne doit en être absolument dépourvu, car tous possèdent une membrane d'enveloppe.

La conclusion générale à tirer de nos expériences comme des travaux antérieurs nous paraît être la suivante : l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène sont des propriétés de la membrane d'enveloppe des microbes; elles sont d'autant plus marquées chez ces êtres que cette membrane est plus importante [2]. Une même conclusion nous paraît devoir s'appliquer aux cellules libres de l'organisme.

Au point de vue pratique, nos expériences n'auront peut-être pas été sans utilité. L'existence de races ou échantillons de bacilles typhiques inagglutinables et inagglutinogènes rend actuellement très délicat le problème de l'analyse des eaux. La difficulté qu'on éprouve à distinguer ces races anormales du bacille d'Eberth de bactéries analogues, mais banales, est souvent extrême. Si les conclusions auxquelles tendent nos expériences se trouvent confirmées, le diagnostic de ces diverses espèces se trouvera simplifié. Tout microbe agglutinable étant

1. Nous pouvons citer à l'appui de cette hypothèse les expériences de M. Malvoz montrant que les bacilles typhiques lavés, c'est-à-dire privés en grande partie de leurs cils, sont infiniment peu sensibles à l'action du sérum spécifique. Ces expériences ont été confirmées par les recherches personnelles d'un de nous (ces *Annales*, loc. cit.) et par celles d'Harrison (*Centralblatt f. Bakt.* 31 août 1901.)

2. Ou plutôt que cette membrane contient en plus grande abondance la substance agglutinable et agglutinogène spécifique.

doué de mobilité, il deviendra inutile de tenir compte dans une analyse d'eau des microbes voisins du bacille d'Eberth inagglutinables par le sérum typhique et mobiles. N'ayant plus à se préoccuper que des bactéries immobiles et inagglutinables, l'expérimentateur devra chercher à leur restituer leurs propriétés disparues. Des cultures successives à une température relativement basse rendront plus facile sans doute le retour de la mobilité originelle. Lorsque la mobilité sera revenue, l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène seront en même temps récupérées et il deviendra facile de reconnaître si le microbe étudié est ou non un bacille typhique légitime.

Une solution complète pourrait donc être obtenue, sauf dans le cas où il s'agirait de microbes ayant perdu définitivement leur mobilité et avec elle l'agglutinabilité et la fonction agglutinogène. Mais nous avons déjà vu qu'il n'était nullement prouvé qu'il existait de ces races, et qu'au contraire dans tous les cas où les échantillons de bacille typhique inagglutinables au moment de leur isolement avaient pu être suivis pendant assez longtemps, le retour de l'agglutinabilité s'était opéré d'une façon constante.

Il serait sans doute téméraire d'ériger dès à présent en loi les quelques réflexions que nous venons de formuler et d'en faire la base de la marche à suivre dans une analyse d'eau pour le diagnostic des formes anormales du bacille typhique. L'avenir montrera quelle est au point de vue pratique la portée exacte de nos expériences.

ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LA TOXICITÉ DE L'ÉOSINE
ET DE QUELQUES AUTRES SUBSTANCES
POUR LES PARAMÉCIES

Par le Dr LEDOUX-LEBARD.

(Travail du laboratoire de M. le Dr Roux.)

Raab[1] a étudié l'action, sur les paramécies, d'un certain nombre de substances dont les solutions aqueuses sont fluorescentes : l'acridine, la méthylphosphine, la quinine, l'éosine. Il a observé que, dans ces solutions, les paramécies meurent plus rapidement à la lumière qu'à l'obscurité. Cet effet de la lumière ne serait pas dû à toutes les radiations, mais seulement à celles qui produisent la fluorescence, soit surtout aux rayons violets pour l'acridine, aux rayons verts pour l'éosine. Aucun développement de substance toxique n'a pu être constaté dans les solutions éclairées. Raab, considérant que la fluorescence est la propriété commune à ces solutions d'acridine, de phosphine, d'éosine, de quinine, dont le pouvoir toxique augmente à la lumière, attribue ce résultat à la fluorescence. Celle-ci est le signe d'une transformation d'énergie qui serait funeste aux paramécies et causerait leur mort[2]. La conclusion est singulière et

1. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien, *Zeitsch. f. Biolog.*, Bd. XXXIX 1900.

2. Raab écrit : « Es ist wahrscheinlich dass fluorescirende Körper die Energie des Lichtstrahlen in lebendeschemische Energie umzusetzen vermögen. »

Tappeiner dans un article de la *Münch med. Woch* (nº 44, 1901) mentionne le travail de Raab et rappelle l'explication donnée par cet auteur: Les substances considérées deviendraient plus toxiques, par la production de la fluorescence, à cause d'une augmentation de leur énergie chimique.

Dans le même article de Tappeiner, on trouvera l'analyse de deux travaux que nous regrettons d'avoir connus trop tardivement pour les citer dans le texte de notre mémoire : celui de Danielsohn qui a étudié l'action sur les infusoires, de différents dérivés de l'acridine et celui de Jacobson qui a observé l'action combinée de l'éosine et de la lumière sur les cellules épithéliales du pharynx de la grenouille et attribue à la fluorescence une action possible sur les phénomènes d'osmose. Il a injecté à des grenouilles 0,02 gram. d'éosine dans l'eau physiologique, en les maintenant à l'obscurité, après cette injection. Au bout de 48 heures, l'épithélium à cils vibratiles était coloré en rouge. Exposés à la lumière dans l'eau physiologique, les cellules perdaient la mobilité de leurs cils, en quelques heures ; à l'obscurité, les cils restaient mobiles pendant plus d'un jour.

l'auteur, après ses intéressantes expériences, nous ramène au point de départ, car il s'agit de savoir comment cette transformation d'énergie produit la mort des paramécies. C'est ce que nous voudrions éclaircir dans ce mémoire.

La technique est semblable à celle que nous avons indiquée dans notre précédent mémoire[1]. On verse la solution à étudier dans un verre de montre et celui-ci est placé dans une boîte de Petri renversée, couvercle en bas, contenant un peu d'eau et servant de chambre humide. Un support plat, lame métallique, pièce de monnaie, sert à maintenir le verre de montre à hauteur suffisante au-dessus de la couche d'eau inférieure. Nous versons 2 c. c. de solution dans le verre de montre, en y ajoutant, suivant la richesse de la culture, un ou plusieurs dixièmes de centimètre cube de culture. Les boîtes de Petri contenant ces dilutions sont, les unes, soumises à l'action de la lumière, les autres, servant de témoins, mises à l'obscurité.

La toxicité des solutions est évaluée d'après le temps nécessaire pour tuer une quantité déterminée de culture. Ou bien, on compte les paramécies tuées, en faisant, s'il est nécessaire, des additions successives de 1/10 c. c. de culture, jusqu'à ce que les paramécies ne meurent plus, dans l'intervalle de 24 heures, à l'obscurité. Les nombres obtenus mesurent le pouvoir toxique des liquides à comparer.

Les paramécies appartiennent à l'espèce P. Caudatum et sont cultivées par le procédé Balbiani[2].

L'éosine utilisée était l'éosine W. G. de Grübler. Une solution mère à 0,50 pour 100, maintenue à l'obscurité, servait à préparer des solutions à titre connu, et particulièrement la solution à 1 : 1000, dont l'action sur les paramécies n'est ni trop lente ni trop rapide et peut être facilement suivie.

On prépare dans un verre de montre 2 c. c. de solution d'éosine à 1 : 1000 additionnée de 1/10 c. c. de culture; le verre de montre est placé dans une boîte de Pétri qu'on expose à la lumière. Une dilution de paramécies identique à la précédente est mise à l'obscurité.

1. Ces *Annales*, juillet 1902.
2. *Arch. d'anat. micr.*, 1898, p. 518.

Les paramécies ne tardent pas à mourir dans l'éosine éclairée; elles nagent d'abord moins rapidement, puis elles abandonnent les couches supérieures du liquide, se tiennent au fond en progressant lentement. Souvent, elles présentent des mouvements de rotation autour de l'axe transversal du corps, ou bien l'axe longitudinal, par un mouvement continu dans le même sens, décrit une surface conique, ayant pour sommet l'une des extrémités. Les vésicules contractiles se paralysent, offrent une dilatation excessive, souvent limitée à l'une d'entre elles. La mort est suivie de la coloration du noyau, puis le protoplasme se colore, à son tour. Des altérations modifiant le pouvoir osmotique du sarcode ou la perméabilité de la membrane d'enveloppe, causent parfois une déformation de l'infusoire, ou bien il se produit des boules transparentes d'exsudation superficielle. Il est assez fréquent de constater une agglutination des paramécies en agglomérations irrégulières.

Dans la solution maintenue à l'obscurité, les paramécies continuent à vivre et à nager, pendant un temps très variable. On en retrouve quelquefois de vivantes après deux ou trois semaines; elles ont diminué de volume et nagent avec lenteur.

Le pouvoir microbicide de l'éosine éclairée augmente avec l'intensité de la lumière. Les paramécies mises dans l'éosine meurent en quelques minutes au soleil, en un temps plus long à l'ombre, et qui augmente, à mesure que la lumière diminue.

Les expériences qui précèdent confirment simplement celles de Raab.

Pour le même éclairement, l'action microbicide est d'autant moins rapide que le nombre des paramécies est plus élevé.

On peut s'assurer facilement, ainsi que l'a fait Raab, que la mort des paramécies, dans l'éosine éclairée, est due aux radiations absorbées et que les autres sont inactives. Il suffit de placer le mélange d'éosine et de paramécies dans un tube qu'on fixe suivant l'axe d'un bocal contenant la même solution d'éosine, et de manière que la surface libre du liquide dans le tube soit inférieure à celle de la solution qui l'entoure. Lorsque celle-ci est en couche suffisamment épaisse, les radiations provoquant la fluorescence de l'éosine n'arrivent plus au tube central; les paramécies continuent à vivre, bien qu'exposées à la lumière.

Contrairement aux conclusions de Raab, nous allons voir que les radiations actives altèrent la composition de l'éosine et y développent une substance toxique pour les paramécies.

On expose au midi, le 26 novembre, à 11 h. 11, par un temps nuageux, un verre de montre contenant 2 c. c. d'éosine à 1 : 1000, en chambre humide. Un autre verre de montre contenant une solution semblable est mis à l'obscurité. Après une heure d'éclairement, on ajoute 1/10 c. c. de paramécies à la première solution et on la met à l'obscurité. On ajoute aussi la même quantité de culture à la seconde solution qu'on laisse à l'obscurité. Cette quantité de culture représente une soixantaine de paramécies.

Au bout de trois quarts d'heure, les paramécies ne nagent plus qu'avec lenteur dans l'éosine éclairée, elles tombent au fond, bientôt elles sont toutes immobilisées et, en moins de 3 heures, la plupart commencent à se colorer. Dans l'éosine non éclairée, toutes les paramécies continuent à nager.

La lumière altère donc la composition de l'éosine. On sait bien que c'est une couleur fugace, peu résistante à la lumière, comme le démontre la décoloration assez rapide, au soleil, des solutions faibles d'éosine. L'expérience qui précède nous apprend qu'il se produit alors une substance toxique qu'il appartient au chimiste de déterminer. Nous voulons montrer seulement qu'à l'aide des paramécies il est possible d'analyser d'un peu plus près quelques-unes des conditions de l'expérience.

L'intensité de la lumière est un facteur important. On expose des solutions d'éosine à 1 : 1000, les unes à une forte lumière, les autres à une lumière faible ; les solutions sont éclairées, par exemple, à des heures différentes du jour. On constate que les paramécies ajoutées, après l'éclairement, meurent d'autant plus vite que la lumière était plus intense.

L'influence de la durée de l'éclairement est moins facile à déterminer avec une lumière variable comme celle du soleil. Si une solution est éclairée plus longtemps qu'une autre et qu'à la fin de l'éclairement l'intensité de la lumière augmente, on pourra attribuer à cette circonstance les résultats observés, aussi bien qu'à la durée plus grande de l'éclairement. Nous avons cherché à éviter cet écueil, dans notre expérience.

Quatre solutions d'éosine à 1 : 1000 : n° 1, n° 2, n° 3, n° 4, ont été exposées à la lumière à la fenêtre du laboratoire, côté sud, le 27 novembre.

N° 1, pendant 1/2 heure, de 11 h. 25 à 11 h. 55.

N° 2, pendant 1 heure, de 11 h. 25 à 12 h. 25.

N° 3, pendant 1 h. 1/2, de 11 h. 11 à 12 h. 41.

N° 4, pendant 2 heures, de 11 h. 11 à 1 h. 11.

Après l'éclairement, les solutions ont été additionnées chacun de 1/10 c. c. de culture et mises à l'obscurité. Les paramécies sont mortes dans n° 1, n° 2, n° 3, n° 4 après des intervalles de temps représentés respectivement par 1 h. 44. 1 h. 37, 1 h. 35, 1 h. 19. Ces temps sont d'autant moins longs que l'éclairement a duré davantage.

Toutefois, la toxicité ne paraît pas augmenter indéfiniment avec la durée de l'éclairement. Des solutions d'éosine à 1 : 1000 ont été exposées à la fenêtre nord du laboratoire pendant le premier jour, puis à des lumières plus faibles pendant les jours suivants. La toxicité des solutions éclairées pendant 6 jours de suite n'était pas supérieure à celle des solutions éclairées pendant le premier ou les deux premiers jours.

D'autres expériences vont nous conduire à l'explication de ces faits : elles ont pour but de montrer en quoi se distingue l'action de l'éosine éclairée, suivant que les paramécies sont ajoutées au début ou à la fin de l'éclairement.

On prépare des dilutions à 1 : 4, à 1 : 2, à 3 : 4, d'une culture de paramécies, et des verres de montre marqués a, b, a′, b′, a″, b″, a‴, b‴, contenant chacun 2 c. c. de solution d'éosine à 1 : 1000.

On ajoute, à la solution a, 4/10 c. c. de la dilution de culture à 1 : 4 ; à la solution a′, 4 1/0 c. c. de la dilution à 1 : 2 ; à la solution a″, 4/10 c. c. de la dilution à 3 : 4 ; à la solution a‴, 4/10 c. c. de la culture elle-même.

On expose alors les solutions a, a′, a″, a‴ à la lumière, ainsi que les solutions b, b′, b″, b‴ auxquelles on a rien ajouté.

On suit avec attention le sort des paramécies. Elles sont mortes au bout de 1 h. 6, dans a. A ce moment, on ajoute aussi à b, 4/10 c. c. de la dilution à 1 : 4 et l'on met b à l'obscurité. Or, il faut 1 h. 55 pour que toutes les paramécies soient mortes dans b.

On répète les mêmes opérations avec a′, b′. Les paramécies

sont mortes dans a′ au bout de 1 h. 16. On ajoute alors à b′ 4/10 de la dilution à 1 : 2 et on met b′ à l'obscurité. Au bout de 4 heures, il y a encore des paramécies vivantes dans b′.

Dans *a″* les paramécies sont tuées en 1 h. 23, mais dans *b*, additionnée, après l'éclairement, de 4/10 c. c. de dilution à 3 : 4, la plupart des paramécies vivent encore le lendemain bien que ralenties dans leurs mouvements.

Dans *a‴* les paramécies sont tuées au bout de 2 h. 9, tandis que dans *b‴* elles survivent presque toutes, après 24 heures.

Les solutions *a* se sont donc montrées plus actives que les solutions *b*. La quantité de substance toxique qui se produit dans l'éosine éclairée est inférieure à celle qui se produit, pendant le même temps, dans une solution semblable contenant des paramécies.

On voit aussi que dans les solutions *b* additionnées de culture, puis éclairées, le temps nécessaire pour tuer les paramécies augmente avec leur nombre, ainsi que nous l'avons dit précédemment.

Il en est de même dans les solutions *b*, additionnées de culture, après l'éclairement. Le temps nécessaire pour tuer les paramécies s'accroît aussi avec le nombre des paramécies, mais ici cet accroissement est très rapide, si bien que les paramécies, lorsqu'elles sont assez nombreuses, finissent par résister.

Ces faits s'expliquent aisément si, dans les mêmes conditions d'intensité lumineuse, de température, la quantité de substance toxique produite sous l'influence de la lumière ne dépasse pas un certain degré de concentration. Les paramécies sont-elles dans l'éosine pendant l'éclairement, elles absorbent la substance toxique qui se reforme aussitôt par l'action de la lumière, est de nouveau absorbée, et ainsi de suite jusqu'à la mort de toutes les paramécies. Celles-ci, au contraire, sont-elles ajoutées à l'éosine préalablement éclairée puis mise à l'obscurité, si leur nombre est assez grand, le pouvoir toxique du liquide s'abaisse au-dessous du degré qui cause la mort, grâce à une absorption de chaque infusoire, la substance nuisible n'est pas renouvelée par l'action de la lumière, la toxicité diminue et permet la survie des organismes.

On comprend ainsi comment l'altération de l'éosine et l'accroissement de toxicité, dus à l'action de la lumière, peuvent

échapper facilement à l'observation, soit qu'on ajoute à la solution préalablement éclairée un nombre très grand de paramécies, soit que, pour un nombre déterminé de ces infusoires, on emploie une quantité trop faible de solution.

L'éosine éclairée, mise à l'obscurité, à la température ordinaire, perd, au bout de 8 à 15 jours, cet accroissement du pouvoir toxique dû à l'éclairement.

L'éosine obtenue par évaporation à 37° ou à la température ordinaire d'une solution éclairée, puis redissoute dans la même quantité d'eau perd sa toxicité surélévée et se comporte comme l'éosine non éclairée.

Le contact de la solution avec l'air pur une large surface favorise l'apparition du pouvoir toxique. Celui-ci est faible lorsque la solution est contenue dans un tube fermé, effilé et rempli de liquide jusque dans l'effilure. Le vide incomplet obtenu à l'aide de la trompe diminue également la production de substance toxique, sous l'influence de la lumière.

La possibilité d'une oxydation de l'éosine éclairée en présence de l'air nous avait conduit à supposer qu'en ajoutant à l'éosine faible (à 1 : 5000) des plantes vertes, le dégagement d'oxygène, à la lumière, favoriserait l'apparition du pouvoir toxique. C'est le contraire qui s'est produit. Une touffe de spirogyres ajoutée à l'éosine à 1 : 5000, avant l'éclairement, supprime le pouvoir toxique : les paramécies ajoutées à la solution après l'éclairement ne meurent pas, comme dans la solution témoin.

L'absorption d'acide carbonique et le dégagement d'oxygène dus à la fonction chlorophyllienne ne paraissent pas intervenir dans ce cas; on obtient en effet le même résultat lorsqu'on ajoute les spyrogyres après l'éclairement. Nous croyons qu'il s'agit plutôt de phénomènes d'absorption, car les mêmes faits se produi sent avec la craie et la poudre de lycopode.

D'autres substances se comportent comme l'éosine, sous l'influence de la lumière; ce sont : l'acridine, la fluorescéine, les sels de quinine. Les solutions de ces corps sont plus toxiques, pour les paramécies, à la lumière qu'à l'obscurité. L'accroissement de toxicité se manifeste également pour les paramécies ajoutées après l'éclairement. On le démontre comme pour l'éosine. Ces

corps s'altèrent à la lumière et donnent naissance à des composés plus toxiques.

Raab, dans ses expériences, s'est servi d'une solution d'acridine à 1 : 20,000, après addition d'acide chlorydrique. C'est aussi une solution à ce titre qui nous a servi dans nos recherches. La fluorescéine à 1 : 1000 s'est montrée sensiblement moins toxique, après éclairement, que l'éosine W. G. au même titre.

Le sulfate de quinine est extrêmement toxique pour les infusoires. D'après Grethe[1], la solution à 1 : 1000 les tue en 2 minutes, la solution à 1 : 10,000 les tue en 2 heures avec signes de paralysie au bout de 5 minutes. Aussi est-il nécessaire, pour mettre en évidence l'action de la lumière de prendre une solution très faible, par exemple à 1 : 50,000. Les résultats observés ont été moins constants qu'avec l'acridine, la fluorescéine et l'éosine.

Les solutions de ces corps sont fluorescentes ; les radiations absorbées se transforment ; si, dans cette transformation, une partie de l'énergie est utilisée pour une action chimique, les produits formés peuvent augmenter la toxicité de la solution primitive. Telle est, croyons-nous, la relation entre la fluorescence et l'apparition ou l'accroissement du pouvoir toxique, sous l'influence de la lumière.

L'organisme des paramécies est un réactif biologique qui permet, à l'aide d'un procédé très simple, de reconnaître soit la production, soit la variation quantitative d'une substance toxique pour les infusoires.

1. *Deutsch. Arch. f. Kl. Med.*, Bd. LVI, 1896.

RECHERCHES

SUR

LE ROLE DE L'ENVELOPPE DES MICROBES

DANS L'AGGLUTINATION

PAR W. DEFALLE

Le point de départ de ces recherches est une observation rapportée par M. Malvoz dans son travail sur l'agglutination du *bacillus typhosus* (1). Ayant filtré et lavé à grande eau sur bougie Chamberland des bacilles d'Eberth-Gaffky qu'il voulait débarrasser des produits de culture dont ils étaient imprégnés, il trouva que les microbes obtenus en raclant la bougie ne s'agglutinaient plus par les substances chimiques actives, formaline, safranine, etc., pas plus que par le typhus-sérum. En même temps, ces bacilles lavés n'étaient plus mobiles et on ne parvenait plus à déceler des cils chez ces microbes. M. Malvoz émit l'hypothèse que peut être les cils jouaient un rôle dans l'agglutination.

Dineur (2) reprit cette recherche, et dans un travail intéressant montra l'importance de l'enveloppe ciliaire dans le phénomène de l'agglutination. Il alla beaucoup plus loin que M. Malvoz en concluant que le mécanisme de la réaction agglutinante subie par le bacille typhique sous l'influence du typhus-sérum ou des agglutinants chimiques de M. Malvoz « est intimement lié à la présence de l'enveloppe ciliée et résulte apparemment des modifications qui atteignent cette dernière. Sous leur influence, les flagella acquièrent la propriété d'adhérer les uns aux autres en s'entremêlant peu à peu et emprisonnant ainsi dans leur réseau les bacilles auxquels ils sont fixés et qu'ils ont entraînés à leur suite ».

Cette interprétation, proposée en 1898, ne serait plus soutenable aujourd'hui, sous cette forme tout au moins, et Dineur lui-

même doit y avoir renoncé depuis que l'on a découvert que des éléments incontestablement dépourvu de cils, tels que les hématies (Bordet, Nolf), les levures (Malvoz) subissent parfaitement l'agglutination par les sérums spécifiques.

Mais l'observation de M. Malvoz que les cils jouent un rôle dans le phénomène de l'agglutination des microbes reste parfaitement soutenable : l'expérience précitée reste un fait contrôlé et amplifié par Dineur et elle ne peut guère être interprétée autrement que ne l'avait fait le professeur de Liége.

D'ailleurs, s'il est parfaitement vrai que des éléments non ciliés (globules du sang, microbes dépourvus de flagella) confèrent au sérum, après leur résorption dans l'organisme, un certain pouvoir agglutinant, les titres d'agglutination sont généralement bien plus élevés avec les bacilles richement ciliés. Jamais, à notre connaissance, on n'a obtenu, même après des injections longtemps continuées soit d'hématies, soit de microbes sans cils tels que le streptocoque, le bacille de la tuberculose, le bacille diphtérique, des titres agglutinatifs comparables à ceux du typhus-sérum obtenu chez certains animaux et qui sont de 1/100,000 et même davantage, c'est-à-dire qu'un litre de ce sérum est capable de *floculer* 100,000 litres d'émulsion de bacille typhique. Courmont (3) cite un titre agglutinant de sérum antitétanique de 1/50,000.

Or, les bacilles typhique et tétanique ont une belle enveloppe de cils longs et flexueux. Le sérum antistreptococcique par contre, bien qu'obtenu à la suite d'injections de streptocoques, agglutine à peine ces derniers : ce microbe est complètement dépourvu d'enveloppe.

Il a paru à M. Malvoz que son hypothèse renfermait encore, à l'heure actuelle, une certaine part de vérité et il nous a engagé à étudier systématiquemént, d'une façon plus étendue qu'on ne l'a fait jusqu'ici, le rôle de l'enveloppe des microbes aussi bien dans le phénomène de l'agglutination que dans la production elle-même des anticorps.

Notre travail a consisté d'abord à réunir une collection de microbes se prêtant particulièrement bien à l'étude de ces phénomènes. Nous avons choisi des bacilles possédant de nombreux cils et d'autres bacilles de même taille approximative, mais peu ou point ciliés. Il fallait se demander aussi quelle influence

pouvait avoir l'enveloppe des microbes, quand celle-ci est constituée non pas par des flagella, mais soit par une couche muqueuse plus ou moins développée qui existe chez certains organismes, soit par une capsule nettement différenciée. Ce qui fait surtout la difficulté d'un bon choix de microbes pour ce genre de recherches, c'est qu'il faut trouver des microorganismes dont on puisse, sans trop de difficultés, obtenir des émulsions riches en microbes isolés et agglutinables; or beaucoup de bacilles et de cocci ne sont pas dissociables dans les liquides physiologiques.

Voici les microbes qui ont servi à nos essais :

1° *Bacillus typhosus* : (*a*) échantillon dit *Gaffky*, provenant du laboratoire de Gaffky, et cultivé depuis longtemps à l'Institut de Liége. Bacille très mobile, avec 12-15 cils longs et flexueux (méthode Van Ermengem); (*b*) échantillon isolé par M. Malvoz : *typhosus V* de sa collection, un peu moins mobile que Gaffky; (*c*) *typhosus* isolé par M. Beco de la rate d'un typhique, très mobile;

2° *Bactérium coli*. Microbe isolé par M. Malvoz des selles de nourrisson, cultivé artificiellement depuis plusieurs années : bacilles peu mobiles, les uns sans cils, les autres avec 1-2-3-4 cils, mais moins longs que ceux du *typhosus*;

3° *Bacille V*, de la collection de M. Malvoz, longs bacilles pourvus de magnifiques cils (12 à 15), très mobiles;

4° *Bacillus mesentericus*, de la collection idem, beaux bacilles avec cils nombreux comme le précédent et très mobiles;

5° *Bacillus mycoïdes*, id., id., id.;

6° *Vaccin 1 du charbon*, de l'Institut Pasteur : bacilles non ciliés, quoique très légèrement mobiles;

7° *Bacillus capsulatus*, isolé par M. Herla et conservé depuis longtemps au laboratoire de Liége. Ce microbe, voisin du pneumo-bacille de Friedländer, présente une capsule muqueuse excessivement épaisse, dont le contour externe est irrégulier, mal délimité; le microbe est enfoui dans cette gangue muqueuse comme un noyau de fruit (la méthode Van Ermengem teinte cette capsule en gris).

8° *Bacillus mucosus*, du laboratoire de Kraal : bacille très court avec capsule muqueuse énorme, visible même sans coloration du microbe;

9° *Bacillus capsulatus de Pfeiffer*, du laboratoire de Kraal, bacille court avec mince capsule muqueuse ;

10° *Bacillus capsulatus septicus*, microbe comme le précédent, mais un peu plus long ;

11° *Pneumobacille de Friedlander :* culture entretenue depuis longtemps à Liége ; ce microbe, qui présente habituellement une capsule dans les cultures fraîches, a perdu celle-ci après un long séjour au laboratoire. Il a pris les dimensions du *B. coli*, immobile, non capsulé ;

12° *Myco-bacterium Phleï*, bacille de la phléole, provenant de l'Institut Pasteur de Lille : c'est un bacille morphologiquement semblable au bacille de la tuberculose, immobile, dépourvu de cils, isolé par Moëller de certaines graminées ;

13° *Micrococcus agilis ruber*, du laboratoire de Kral, microcoque mobile, avec cils ;

14° *Microcoque*, microbe banal recueilli dans les eaux, immobile sans cils ;

15° *Spores de divers microbes* (*B. mycoïdes*, *B. mesentericus*, *B. alveï*, etc.) : on les obtient presque complètement débarrassées de leurs bacilles par des cultures sur gélose sans peptone, dont on prépare de bonnes émulsions. Ces spores ont une membrane résistante, pas d'enveloppe muqueuse ni de cils ;

16° *Levure du vin de Huy*, isolée par M. Malvoz, belles cellules avec une membrane nette à double contour ; les cultures s'émulsionnent bien, en éléments isolés, en eau physiologique.

Tous ces microorganismes se développent bien sur gélose nutritive au bouillon de viande (pour la levure, on prend de l'agar à l'eau de malt). Les injections faites aux animaux étaient préparées en broyant le dépôt de la culture dans l'eau physiologique à 9 0/0.

Le phénomène de l'agglutination — soit dit une fois pour toutes — a toujours été étudié par addition du liquide agglutinant non pas à des microbes en bouillon (ce qui complique le phénomène à cause des produits variés des bouillons), mais à des émulsions de microbes pris sur gélose, bien dissociés en eau salée à 9 0/0. On ajoute d'abord une anse de sérum, par exemple, à une anse d'émulsion sur porte-objet, puis on dilue le sérum à 1 p. 10, 1 p. 20, etc., etc., et on ajoute chaque fois une anse de cette dilution à une anse d'émulsion.

Il est clair que s'il y a agglutination nette quand on ajoute une anse de la dilution à 1 p. 20 à une anse d'émulsion, le titre du sérum sera de 1/40.

L'observation du phénomène a toujours été faite pendant le même temps, (une heure à peu près).

Pour ce qui concerne un des microbes étudiés, le *Mycobacterium phleï*, on n'obtient des émulsions homogènes qu'en usant d'un artifice : il faut d'abord broyer le dépôt de la culture sur gélose, dans un mortier d'agathe avec de l'eau physiologique, puis, après avoir trituré longtemps, on jette le liquide trouble sur un petit filtre de papier Schleicher mouillé; le liquide qui passe, légèrement opalescent, montre des bacilles fins et grêles, suffisamment isolés pour l'étude de l'agglutination. Ce microbe est tout à fait semblable, morphologiquement, au bacille de la tuberculose.

Une première série de recherches a consisté dans l'injection ntrapéritonéale, à des cobayes, de ces divers microbes, dans le but de comparer le pouvoir agglutinant du sérum obtenu. Chaque microbe est cultivé sur gélose nutritive; on émulsionne le dépôt de la culture dans 1 c. c. d'eau physiologique; on chauffe une 1/2 heure à 57° (sinon les microbes pathogènes injectés vivants, comme le bacille typhique, tuent souvent le cobaye), et on pousse l'injection dans la cavité péritonéale à travers une petite incision de la paroi du ventre. On mesure, avant l'injection, le pouvoir agglutinant du sérum normal vis-à-vis du microbe injecté : aucun microbe n'était agglutiné par le sérum normal de cobaye (dans les conditions déjà décrites de notre technique de mensuration) même à parties égales de sérum et d'émulsion de microbes, sauf le *B. coli* qui subissait une légère agglutination, mais pas au-delà du titre de 1/5. Beaucoup de sérums normaux agglutinent plus ou moins le *B. coli*, ce qui est sans doute dû à la résorption physiologique de cadavres de ce bacille si abondant dans le tractus intestinal, et à la production consécutive d'une petite quantité d'anticorps.

Dix jours après la première injection à cette série de cobayes, on recueille du sérum et on mesure son pouvoir agglutinant. On obtient les titres suivants, comme taux extrêmes du phénomène :

Typhosus 1/70; *B. mycoïdes* 1/60; *Mesentericus* 1/10; Bacille V 1/50; *Capsulatus septicus* 1/35; *Capsulatus Herla* 1/25 ; Vaccin 1

Paris 1/15; *B. coli* 1/20; pneumobacille de Friedländer 1/1; *Capsulatus* de Pfeiffer 1/1; *Mycobacterium phleï* 1/1; *Micrococcus agilis* 1/1; levure de Huy 1/1; microcoque banal de l'air 0;

On constate de plus que le sérum Friedländer qui n'agglutine presque pas les microbes de l'espèce injectée agglutine à 1/15 le *Capsulatus Herla*, la réciproque ne se produit pas. Le sérum Pfeiffer agglutine le *Septicus* à 1/25.

On pousse une nouvelle injection et on constate, après 10 jours, (ce qui est le moment le plus favorable pour le titrage des agglutinines), que le titre de l'agglutination n'a augmenté sensiblement que chez les cobayes injectés de :

B. typhosus 1/140; *B. mycoïdes* 1/130; *B. mesentericus* 1/140, bacille V 1/110; *B. coli* 1/50, *Capsulatus* 1/50; *Micrococcus agilis* 1/15.

Or, si l'on s'en rapporte à la description morphologique de ces microbes, on est immédiatement frappé de ce fait que c'est l'injection des microbes ciliés, ou enveloppés d'une épaisse gaine muqueuse, qui a conféré au sérum le pouvoir agglutinant le plus considérable.

De plus, parmi les microbes ciliés, ce sont les éléments possédant le plus de flagella qui se montrent surtout sensibles aux agglutinines : le *B. coli*, qui possède moins de cils que le *Typhosus ;* le *Mycoïdes*, etc., agglutine moins fortement que ces microbes.

Quant aux divers microbes dit capsulés, on constate que ceux qui produisent le plus d'agglutinines, dans le sérum, sont les *Capsulatus Herla ;* au contraire, le pneumobacille de Friedländer et le *Capsulatus* de Pfeiffer ont présenté des titres très faibles d'agglutination. Ce sont cependant des microbes de la même famille naturelle; mais, comme il a été dit dans la description de ces microorganismes, tandis que les microbes de Herla et le *Capsulatus septicus* avaient conservé dans les milieux artificiels une capsule muqueuse très développée, celle-ci était devenue extrêmement réduite pour les microbes de Friedländer et de Pfeiffer; ce fait a été cité, d'ailleurs, par d'autres observateurs, et il est admis aujourd'hui que des microbes d'un même groupe peuvent perdre leur capsule dans les milieux de culture des laboratoires [1]. Ce qui prouve bien que ces microbes appartien-

1. D'après Danysz, certains microbes s'entourent d'une gaine muqueuse dans un but de protection contre des éléments nuisibles (charbon et arsenic).

nent à un même groupe naturel, à ce groupe étudié tout récemment encore par Clairmont (4) dans un travail très complet, c'est que le sérum Friedländer agglutine le *C. Herla* et le sérum Pfeiffer le *Septicus*.

Le vaccin du charbon s'est comporté non comme les microbes ciliés, mais comme les éléments revêtus d'une capsule muqueuse tels que le *B. capsulatus* de Herla. Or, on sait que le bacille du charbon est enveloppé d'une gaine muqueuse bien visible dans les cultures fraîches et dans le sang des animaux charbonneux.

Ce ne sont donc pas seulement les microbes à flagella qui sont particulièrement sensibles à l'action des sérums agglutinants, mais la gaine muqueuse enveloppante de certains bacilles joue également un rôle dans le phénomène de l'agglutination.

Le fait suivant vient encore à l'appui de cette thèse : il existe un microbe, le *Capsulatus mucosus* qui, d'après le travail classique de Clairmont, appartient à la même famille que le Friedländer, le *C. Herla*, le Pfeiffer, etc. C'est un bacille court engainé dans une gangue muqueuse tellement considérable que les microbes sont véritablement englués dans celle-ci : il est même impossible d'obtenir avec ce microbe des émulsions homogènes permettant la mesure de leurs agglutinines. Mais on peut injecter le *C. mucosus* à des cobayes et mesurer le titre d'agglutination non pas sur le *mucosus* lui-même, mais sur les autres représentants de ce groupe naturel se prêtant à la floculation. Eh bien, le sérum mucosus agglutinait après deux injections au cobaye, la *Capsulatus Herla* à 1/20, mais était sans action sensible sur le Friedländer et le Pfeiffer.

Continuant dans cette voie, nous avons encore comparé, d'une façon plus précise, le sérum Herla et le sérum Friedländer.

Nous avons injecté à 2 chiens des cultures jeunes de ces microbes (cultures gélose) dans le tissu cellulaire sous-cutané.

Après 8 injections faites de 2 en 2 jours, le chien — Herla donne un sérum agglutinant ce microbe à 1/170 mais sans action sur le bacille de Friedländer ; inversement, le sérum du chien Friedländer agglutine le B. de Herla à 1/40, mais nullement le microbe de Friedländer lui-même.

Après 22 injections, le titre agglutinatif du sérum Herla pour le B. de Herla est de 1/200, mais l'agglutination du B. de Fried-

länder est toujours nulle; réciproquement, le sérum du chien Friedländer agglutine le *Capsulatus Herla* à 1/120, mais est sans action sur le Friedländer.

Comment méconnaître dans l'interprétation de ces résultats la haute importance de l'enveloppe microbienne dans la sensibilité aux agglutinines, puisque voilà 2 microbes considérés comme très voisins dans la systématique bactérologique, qui ne diffèrent que par la constitution de leur paroi, et qui se comportent tout différemment en présence des sérums spécifiques?

Les bacilles dépourvus de cils ou de capsule muqueuse non seulement sont peu agglutinables, mais ils confèrent au sérum des animaux injectés un pouvoir agglutinant qui reste toujours relativement peu élevé.

Tout particulièrement démonstratives sont les deux expériences suivantes :

D'une part, on injecte à un chien, sous la peau, des cultures chauffées du bacille V (bâtonnets pourvus de 10-15 flagella); à un autre chien des cultures de *mycobacterium phleï*, en milieu de Hesse et également chauffées 1/2 heure à 60°.

Après 6 injections, le sérum du chien du bacille V agglutine ce bacille à 1/600. tandis que le sérum du chien injecté de b. *phleï*. agglutine 1/20.

On a continué les injections de ce dernier microbe tantôt 2 c. c., tantôt 4 c. c., tantôt 10 c. c. à la fois, pendant plusieurs mois. En tout, le chien reçut 100 c. c. de culture de b. phléole : il n'a pas été possible de pousser le titre agglutinatif au delà de 1/20. Les émulsions homogènes du b. *phleï* étaient préparées comme il a été dit.

Les injections du même microbe chez le lapin n'ont pas donné un pouvoir agglutinant plus élevé que chez le chien.

Le bacille *phleï* ressemble beaucoup au bacille de la tuberculose. On sait que la séro-réaction dans la tuberculose reste habituellement faible, en ce sens que les titres agglutinants sont généralement de 1/10, 1/20, 1/50 maximum, alors que dans la fièvre typhoïde chez l'homme on a souvent noté une agglutination pouvant aller à 1/1000 et même davantage. Le bacille *phleï* comme le *B. tuberculosis* n'a ni flagella ni enveloppe muqueuse analogue à celles de certains microbes capsulés : de là leur faible agglutination.

Nous ferons remarquer, en passant, que l'on a donné (Beco, de Nobele, entre autres) des titres agglutinants relativement considérables pour une variété de bacille de la tuberculose, qui est le bacille d'Arloing Courmont.

Ce bacille, dont la morphologie n'a pas encore été bien étudiée, est donné comme légèrement mobile dans les bouillons et les émulsions; peut-être présente-t-il soit de petits flagella, soit une gaine enveloppante particulièrement sensible aux agglutinines.

De plus, les injections faites avec ce microbe, et qui ont conféré au sérum un pouvoir agglutinant allant jusque 1/200 et parfois plus, étaient faites non avec des émulsions en eau salée, mais avec des cultures en bouillon; de plus l'agglutination elle-même était vérifiée sur ces mêmes cultures. Nous croyons que de cette façon il se produit non seulement des agglutinines pour le microbe, mais des précipitines pour certaines substances du bouillon de culture, d'où l'augmentation *apparente* du titre d'agglutination. Il faudrait injecter des émulsions en eau salée de bacilles d'Arloing et éprouver le sérum sur une telle émulsion pour vérifier si notre hypothèse est bien exacte.

Si l'on compare les microbes ciliés entre eux, il apparaît bien encore qu'il y a réellement un rapport entre le nombre et l'importance des flagella et l'agglutination.

Prenons deux microbes inégalement ciliés, l'un le *B. typhosus* (12-15 cils), l'autre le *B. coli* (1-2-3-4 cils), et injectons-les à des lapins. Après 5 injections de 1 c. c., faites de 4 en 4 jours, le sérum du lapin-typhosus produit de grands flocons visibles à l'œil nu dans l'émulsion, tandis qu'on ne voit qu'au microscope les petits amas des microbes agglutinés par le sérum-coli.

Voici, du reste, des résultats qui viennent d'être publiés dans un travail de Castellani (5) et qui montrent très nettement le rôle des flagella dans l'agglutination. Le travail de Castellani n'a pas été fait au point de vue où nous nous plaçons : il voulait vérifier si les animaux injectés de divers microbes en même temps présentaient un sérum les agglutinant tous, et il commença par injecter séparément chaque microbe; il a pris très soigneusement, jour par jour, les titres agglutinatifs, qu'il consigne dans les tableaux que nous reproduisons ci-dessous et qui se rapportent à des injections de *B. typhosus* et de *B. coli*.

LAPIN INJECTÉ AVEC 3 CENTIMÈTRES CUBES DE CULTURE EN BOUILLON DE BACILLE « TYPHOSUS » VIVANT

Nos des animaux.	TITRE D'AGGLUTINATION POUR LE BACILLE TYPHIQUE								
	Avant l'injection.	Après 3 jours.	Après 5 jours.	Après 7 jours.	Après 10 jours.	Après 15 jours.	Après 30 jours.	Après 60 jours.	Après 120 jours.
8	20	50	500	4.000	8.000	10.000	4.000	200	50
9	0	40	250	2.000	10.000	10.000	2.500		
10	40	100	800	5.000	10.000	10.000	2.000		
11	10	10	200	1.000	4.000	2.000			
12	10	150	1.000	5.000	10.000				

LAPIN INJECTÉ AVEC 3 CENTIMÈTRES CUBES DE CULTURE EN BOUILLON DE BACILLE « COLI » VIVANT

Nos des animaux.	TITRE D'AGGLUTINATION POUR LE BACILLE COLI								
	Avant l'injection.	Après 3 jours.	Après 5 jours.	Après 7 jours.	Après 10 jours.	Après 15 jours.	Après 30 jours.	Après 60 jours.	Après 120 jours.
16	40	40	100	250	1.000	1.000	200	50	50
17	10	20	200	1.000	2.000	1.500			
18	20	20	250	400	2.000	2.000	200		

Il suffit de jeter un coup d'œil sur ces tableaux, pour être immédiatement frappé de la moindre sensibilité du *B. coli* à ses agglutinines, comparativement au *B. typhosus* : généralement, 10 à 15 jours après l'injection, le typhus sérum agglutine le *B. typhosus* à un titre presque dix fois supérieur à celui du coli-sérum sur le *B. coli*.

On pourrait croire qu'en injectant, comme on l'a fait dans ces expériences, des cultures en bouillon, celles-ci renferment proportionnellement plus de corps microbiens dans un même volume quand il s'agit du *B. typhosus* et que c'est là la raison du pouvoir agglutinant plus considérable du typhus sérum. Mais c'est le contraire qui est vrai : le *B. coli* en bouillon est plus prolifique que le *B. typhosus* et certainement dans les expériences dont les résultats viennent d'être transcrits, on injectait plutôt davantage de *B. coli* que de *B. typhosus*.

Voilà donc deux microbes, morphologiquement très voisins, constitués par des bâtonnets de dimensions égales, ayant des propriétés biologiques très voisines, puisque certains bactériologistes ont été jusqu'à les considérer comme appartenant à une seule espèce, et qui se comportent tout différemment vis-à-vis de leur sérum spécifique : mais l'un présente de nombreux flagella, l'autre deux ou trois cils seulement, et c'est là certainement une des raisons principales de leur sensibilité différente à leurs agglutinines.

On sait que les microbes ne sont pas seulement agglutinables par les sérums préparés contre eux, mais que certaines substances chimiques bien définies, ainsi que les recherches de M. Malvoz (6) l'ont montré, produisent très nettement un phénomène identique : telles sont la formaline, l'alcool, l'acide acétique plus ou moins dilué, la soude, etc., etc.

Ces agglutinants, dits chimiques, se comportent-ils vis-à-vis des microbes ciliés et capsulés comme les sérums spécifiques, en ce sens que, toutes choses égales d'ailleurs, un microbe à flagella par exemple sera plus facilement agglutiné qu'un microbe dépourvu de cils ?

Nous avons institué toute une série de recherches dans cette direction. A des émulsions en eau physiologique des divers microbes de la collection, nous avons ajouté des proportions très variées de formaline, d'alcool, d'acide acétique, de soude, etc., etc., et nous avons observé l'agglutination éventuelle, aussi bien à l'œil nu qu'au microscope. Nous ne nous attendions nullement à obtenir dans cette série d'essais des résultats aussi nets qu'avec les sérums spécifiques. Comme le fait très justement remarquer Nolf dans son travail classique sur les sérums antihématiques (7), les agents chimiques proprement dits, qui sont capables de provoquer l'agglutination des microbes, déploient une activité plus brutale que le sérum spécifique. L'agglutination de celui-ci, quand il est suffisamment dilué, produit à peine une légère modification de la surface du microbe, suffisante néanmoins pour être le point de départ d'une agglutination. Au contraire, une substance chimique agglutinante saisit plus brusquement et modifie plus fortement les éléments microbiens : nous avons vu ces derniers perdre immédiatement leurs mouvements, et se rapprocher de suite en quel

ques instants, ce qui ne peut être dû qu'à une altération considérable et rapide de l'enveloppe.

Néanmoins, on se rend très bien compte que l'acide acétique, par exemple, agglutine encore très bien, à certaines dilutions, les microbes ciliés ou les éléments entourés d'une capsule muqueuse, alors que le phénomène ne se produit plus sur les autres microbes.

Le *B. typhosus* est encore agglutiné par l'acide acétique à la dilution de 1/3600, le *capsulatus Herla* à 1/4500, le *B. coli* à 1/1300, le *microc. agilis* à 1/300.

Au contraire le *mycobacterium phleï* n'est plus agglutiné au delà de 1/100 d'acide acétique, le microcoque banal de l'air à 1/15 maximum et le B. de Friedlander à 1/10.

La formaline agglutine bien le *B. typhosus* et pas le *B. coli*, ni le B. de Friedländer, il en est de même pour le sublimé à 20/00.

L'alcool absolu est très agglutinant pour le bacille mycoïdes (très cilié) le *capsulatus Herla* (enveloppe muqueuse énorme), bien agglutinant pour le *B. typhosus*, moins pour le *B. coli*, nullement pour le B. de Friedländer, la levure, les spores, le B. de la phléole, etc., éléments non ciliés ni entourés d'une capsule muqueuse.

Avec la soude à des dilutions de 1 p. 60 à 1 p. 100, à cause de la réaction brutale de cette substance sur l'enveloppe très délicate des microbes, on n'observe plus, d'un élément microbien à l'autre, que des différences trop peu considérables pour qu'il y ait intérêt à les citer ici.

Les observations que nous venons d'exposer plaident certes en faveur du rôle considérable que l'enveloppe microbienne joue dans le phénomène de l'agglutination. Mais, dira-t-on, entre tous ces microbes si variés, n'y a-t-il pas d'autres propriétés que celle qui tient à la nature de leur gaine externe auxquelles il faudrait attribuer la raison des différences qui se manifestent d'une espèce à l'autre au point de vue de l'agglutination ?

Bien qu'il nous paraisse que l'ensemble des faits réunis dans ce travail plaide singulièrement en faveur d'une influence prépondérante des caractères de l'enveloppe microbienne dans la sensibilité aux agglutinines, la thèse soutenue serait bien plus solide encore si les expériences s'appuyaient non plus sur

des microbes d'espèces différentes, mais sur une seule et même espèce de bacilles, dont on produirait à volonté des modifications de l'enveloppe ciliaire.

Certains observateurs (Migula entre autres, 8), ont cité certains microbes, tel que le *microbacillus prodigiosus*, qui ne présentent des cils que quand on les cultive à une température déterminée. Ce fait nous autorisait à rechercher s'il ne serait pas possible, avec un seul et même microbe à flagella, d'obtenir une variété richement ciliée, et une autre sinon dépourvue de cils, tout au moins présentant une enveloppe très réduite.

Après avoir tenté bien des essais variés, qu'il est inutile de rapporter ici, nous avons réussi, pour ainsi dire au delà de ce que nous espérions, en choisissant comme microbe le *B. mycoïdes*, qui est un excellent élément d'études.

Le *B. mycoïdes*, cultivé à l'étuve à 37°, sur gélose nutritive peptonisée ordinaire et repiquée chaque jour, se présente comme un beau bacille très mobile, et pourvu de nombreux cils longs et flexueux plus beaux encore que ceux du *B. typhosus* (méthode Van Ermengem). Mais si on examine une culture sur agar, ensemencée non plus avec un microbe ayant poussé lui-même sur agar peptonisé, mais avec des spores de *B. mycoïdes*, l'aspect du microbes est tout différent. Les spores sont obtenues très facilement et en abondance si on ensemence du *B. mycoïdes* à 37° sur de la gélose *non peptonisée* : après 4 ou 5 jours, on ne voit presque plus que des spores. Il est nécessaire qu'il n'y ait plus de bacilles visibles à côté des spores. Prenons une oese de ces spores, ensemençons-les sur agar nutritif peptonisé ordinaire et plaçons à 37° : le lendemain, on constate que toutes ces spores ont germé, mais les bacilles qui en sont issus, tout en ayant les dimensions du *B. mycoïdes* ordinaire, sont infiniment moins mobiles, et par l'emploi de la méthode Van Ermengem, on ne leur trouve qu'une enveloppe très réduite, avec cils rares et courts, ou même sans cils du tout. Ce fait n'est pas accidentel : il se produit avec une régularité constante, et nous avons obtenu ces bacilles à enveloppe ciliaire rudimentaire aussi souvent que nous l'avons voulu. Les agglutinants chimiques, tels que l'acide acétique et la soude, agissent beaucoup mieux sur la variété ciliée que sur l'autre : la première est encore agglutinée par l'acide acétique jusque 1/1000, la

soude jusque 1/80, la seconde ne l'est plus à ces dilutions des réactifs.

En possession de bacilles mycoïdes très ciliés et peu ciliés, nous avons injecté à des cobayes des émulsions des deux variétés de microbes, préparées de façon identique et contenant très approximativement le même nombre d'éléments (dépôt d'un tube de gélose émulsionnée dans 2 c. c. d'eau physiologique).

Huit jours après cette injection, le sérum du cobaye traité par le mycoïdes très cilié produit une agglutination de cette variété du microbe jusqu'au titre de 1/50; il agglutine le microbe peu cilié, moins fortement, jusqu'au titre de 1/20, mais le sérum du cobaye ayant reçu le microbe peu cilié n'agglutine ni l'une ni l'autre des 2 variétés de bacilles.

On fait de nouvelles injections à deux autres cobayes et on les répète à 10 jours d'intervalle. 8 jours après, le sérum présente les propriétés suivantes : le sérum du cobaye traité par la variété très ciliée, agglutine à la fois les 2 variétés, mais la ciliée plus que l'autre ; mais le sérum de l'autre cobaye injecté 2 fois de microbes peu ciliés, s'il agglutine maintenant légèrement le bacille peu cilié (ce qui ne se produit pas après une seule injection) agglutine beaucoup plus fortement la variété ciliée.

Ces faits, que nous avons contrôlés plusieurs fois, se sont produits avec une grande netteté. Aussi croyons-nous qu'ils apportent la preuve décisive du grand rôle joué par l'enveloppe ciliaire dans l'agglutination. Ils prouvent non seulement qu'un microbe pourvu de grands et nombreux cils est plus agglutinable, toutes choses égales d'ailleurs, qu'un bacille à tunique ciliée incomplète, mais, en outre, qu'à la suite de l'injection d'une variété peu ciliée il apparaît proportionnellement moins d'agglutinines dans le sérum que chez les animaux traités par les bacilles à nombreux flagella, puisque après une première injection de *B. mycoïdes*, variété peu ciliée, le sérum n'agglutine encore aucune des deux variétés. C'est un fait expérimental qu'avait prévu M. Nolf dans son travail sur les sérums antihématiques, lorsqu'il annonçait qu'à son avis il devait y avoir avantage au point de vue de la production abondante d'anticorps, tels que les agglutinines, à injecter des éléments à enve-

loppe très développée comparativement au poids du microbe.

Pendant le cours de ces recherches a paru un travail de Harrison (9) qui a montré que les bacilles typhiques en partie digérés par la pyocyanase et dépouillés ainsi de leurs couches externes ne sont plus agglutinables par le typhus sérum.

Ce n'est pas seulement le phénomène de l'agglutination des microbes qui est influencé par la nature de l'enveloppe des microbes : les substances du sérum, appelées *sensibilisatrices* par Bordet, *fixateurs* par Metchnikof sont aussi plus facilement décelables vis-à-vis des éléments à tunique développée.

Si on compare, à ce point de vue, les sérums des cobayes ayant servi aux essais précédents, on obtient les résultats suivants :

La recherche des sensibilisatrices a été faite par la méthode Bordet-Gengou : les microbes sont traités par une certaine proportion (3 parties) du sérum spécifique chauffé à 56° additionné d'alexine fraîche. Après quelques heures on détermine si cette alexine est ou non fixée, en d'autres termes si les microbes sont ou non sensibilisés, par l'addition d'hématies sensibilisées elles, mêmes par un sérum hémolytique chauffé à 56° : s'il n'y à pas d'hémolyse, c'est que les microbes ont été sensibilisés et inversement.

Bien entendu, on fait des témoins dans lesquel le sérum spécifique est remplacé tantôt par de l'eau salée, tantôt par un sérum normal chauffé.

Dans ces conditions, nous avons observé que le sérum du cobaye traité par la variété très ciliée de mycoïdes, et qui agglutine si nettement ce microbe, le sensibilise fortement, tandis que la variété peu ciliée ne fixe presque pas l'alexine, ce qui montre qu'elle a retenu peu de fixateurs.

Le sérum du cobaye, ayant reçu la variété peu ciliée, renferme d'abord moins de fixateurs que le précédent et de plus ces fixateurs impressionnent bien plus la variété ciliée que l'autre.

On ne possède pas encore à l'heure actuelle de méthode précise de titrage des substances sensibilisatrices, mais l'observation de la rapidité et de l'intensité de l'hémolyse dans les divers essais précédents ne laisse pas de doute sur les relations étroites qui existent, aussi bien au point de vue de leur abondance dans le sérum que de l'impressionnabilité des éléments au

sérum lui-même, entre cils et sensibilisatrices, comme entre cils et agglutinines.

On ne peut plus douter, semble-t-il, du rôle dominant de la substance enveloppante des microbes dans le phénomène de l'agglutination. Et il semble bien que l'on puisse dire que les agglutinines sont réellement les anticorps de l'enveloppe microbiennne, quelle que soit la nature de cette dernière. Ce qui le prouve bien, c'est que des éléments, telles que les levures, qui sont pourvus d'une belle capsule différenciée, de nature très résistante, sont encore agglutinables et confèrent au sérum un pouvoir agglutinant quand on se sert de levures réduites à cette capsule. M. Malvoz a placé pendant trois mois sous le chloroforme la levure du vin de Huy ayant poussé abondamment sur gélose à l'eau de malt. On sait que, dans ces conditions, se produit une auto-digestion par des ferments spéciaux de la levure. L'examen microscopique montre des coques pour ainsi dire vides, quand on a lavé plusieurs fois à l'eau physiologique; il reste seulement au centre de l'élément quelques granulations se colorant en gris noirâtre par l'acidité osmique, solubles dans un mélange d'alcool et d'éther (matières grasses). On a injecté ces levures ainsi réduites à leur capsule à des lapins, comparativement avec d'autres lapins traités par des levures moins digérées. Après quelques injections, le sérum était aussi agglutinant chez les uns et les autres animaux (titre 1/80), et l'agglutination se produisait aussi facilement sur les levures vides que sur les levures intactes.

Les sensibilisatrices se sont formées également bien dans les deux séries d'animaux, c'est-à-dire que la résorption des coques de levure injectées aux lapins est suivie de la production non seulement d'agglutines, mais de fixateurs et ces fixateurs sensibilisent non seulement les levures normales, mais les levures vides de leur contenu.

De plus, si on chauffe les levures à 115°, leur injection confère au sérum à la fois le pouvoir agglutinant et sensibilisateur, tout comme les spores microbiennes, et à la différence des microbes dépourvus d'une capsule résistante du type de celle de la levure.

Si on traite les levures par des substances destructives du protoplasme (eau de javelle), on note, après des lavages à l'eau

physiologique, que les levures sont encore agglutinées par leur sérum spécifique et au même titre que les levures intactes.

Des faits expérimentaux d'un autre ordre ne peuvent s'expliquer qu'en admettant une influence toute particulière des substances constituant l'enveloppe microbienne dans la production des agglutinines et dans le degré de sensibilité à ces dernières.

Nous avons injecté à un cobaye du *B. mycoïdes* vivant : après 2 injections, son sérum agglutinait le bacille vivant jusqu'au titre de 1/130, mais vis-à-vis des mêmes bacilles préalablement chauffés à 115°, l'agglutination positive, avec une forte concentration du sérum, ne dépassait pas le titre de 1/20. Si au lieu de bacilles mycoïdes vivants on injecte les mêmes bacilles chauffés à 115°, le sérum n'agglutine plus les microbes vivants, comme les microbes traités à 115°, qu'à 1/10.

Un sérum antityphique très actif (provenant de M. Van de Velde) qui agglutinait le *B. typhosus Gaffky* à 1/1.300, n'agglutine le bacille chauffé à 115° qu'à 1/400 Nous avons injecté à un cobaye du *B. typhosus* chauffé à 115° : ce sérum n'a pas agglutiné le bacille chauffé à cette température; quant à son action sur le bacille vivant, l'agglutination n'a pas dépassé le titre de 1/10, alors que le cobaye traité par une seule injection de *B. typhosus* non modifié à 115° fournit un sérum dont le titre agglutinant dépasse toujours 1/100.

Par contre, si au lieu de microbes à tunique ciliée délicate comme les précédents, on se sert, pour des expériences de même genre, d'éléments à capsule très résistante aux agents physiques, tels que les levures et les spores, ceux-ci chauffés à 115° et injectés ensuite confèrent au sérum un pouvoir agglutinant presque aussi considérable que dans le cas de l'injection d'éléments normaux et, de plus, la sensibilité de ces spores et de ces levures aux agglutinines reste considérable.

Ces faits ne peuvent être interprétés qu'en admettant que chez les microbes à cils délicats une température de 115° produit une telle altération des substances qui constituent cette enveloppe que la production des agglutinines et beaucoup moins forte qu'à la suite de l'injection de microbes non altérés ou chauffés seulement à 60°, de même que les substances dites agglutinables de la tunique ciliée sont également altérées à 115°. Au contraire, la capsule des spores et des levures doit être constituée par des subs-

tances beaucoup moins altérables à 115° : de là la production considérable d'anticorps à la suite de l'injection de ces éléments ainsi chauffés, et leur sensibilité toujours considérable aux agglutinines.

En résumé, les anticorps tels que les agglutinines et même dans une certaine mesure tout au moins les sensibilisatrices apparaissent comme des produits formés dans l'organisme à la suite de la résorption des enveloppes microbiennes : toutes choses égales d'ailleurs, plus est développée la couche périphérique d'un élément microbien, plus riche est-elle en substances capables de provoquer une réaction organique, plus abondante sera la production d'anticorps, et plus sensible aussi sera le microbe lui-même vis-à-vis de ces derniers.

Il y aura lieu dans la pratique de tenir compte de ces caractères de la gaine d'enveloppe des microbes, plus qu'on ne l'a fait jusqu'à présent, dans le diagnostic des microorganismes par les sérums spécifiques. On sait notamment qu'en injectant certaines races de *B. coli*, le sérum obtenu est plus agglutinant vis-à-vis d'autres races de coli-bacilles que vis-à-vis du microbe injecté lui-même : or, rien ne varie davantage, d'un échantillon de *B. coli* à l'autre, que la longueur et le nombre des cils et il parait certain, d'après nos expériences, que le microbe le plus cilié sera celui qui aura le plus de chances d'être le mieux agglutiné par un sérum donné. Les variations si considérables observées dans les titres d'agglutination des sérums obtenus contre tous ces bacilles de la même famille naturelle (*B. enteritidis*) bacilles de Sirault, bacille de Moorzeele, etc.), qui jouent un si grand rôle dans certains accidents alimentaires ne sont peut-être dues qu'aux caractères particuliers de leur tunique ciliée.

Rien ne dit qu'il ne puisse se trouver dans la nature ou dans des cultures artificielles des microbes qui ont plus ou moins perdu leurs flagella tels que le *B. typhosus* : or un tel microbe se montrera fort peu sensible au typhus-sérum et de plus son injection provoquera la formation d'une proportion modérée d'agglutinines. L'emploi d'un tel sérum exposera à des erreurs graves celui qui ne tiendra pas compte des caractères spéciaux de la morphologie du microbe qui a servi aux injections ou du bacille vis-à-vis duquel on a vérifié son activité.

BIBLIOGRAPHIE

1. Malvoz, Agglutination du *Bacillus typhosus* par des substances chimiques, *Annales Pasteur*, nº 6, 1897.

2. Dinéur, Recherches sur le mécanisme de l'agglutination du bacille typhique. *Bulletin de l'Académie de médecine de Belgique*, 1898.

3. Courmont, Deuxième note sur l'agglutination du bacille de Nicolaïer, *Société de biologie,* 4 mars 1899.

4. Clairmont, Differential diagnostische Untersuchungen über Kapselbakterien *Zeitschrift für Hygiene.* Bd. XXXIX, 1902.

5. Castellani, Die Agglutination bei gemischter Infection. *Zeitschrift für Hygiene.* XL, 1.

6. Castelanni, *loco citato.*

7. Nolf, Contribution à l'étude des sérums antihématiques. *Annales Pasteur*, 1900, nº 5.

8. Migula, *System der Bakterien.* Bd. I, p. 128 et suivantes.

9. Harrisson, The Agglutinating Substance. *Centralblatt für Bakteriologie*, vol. XXX, nº 3.

Le cours et les manipulations du service d'analyse et de chimie appliqué, à l'hygiène (3e année), commenceront en novembre.

Ce cours s'adresse spécialement aux pharmaciens, médecins et chimistes, industriels.

S'adresser pour renseignements à l'Institut Pasteur, 26, rue Dutot.

LES ACCIDENTS CONSÉCUTIFS AUX VACCINATIONS

LEUR PATHOGÉNIE ET LEUR PROPHYLAXIE

PAR M. E. LECLAINCHE, DE TOULOUSE, ET M. H. VALLEE, D'ALFORT.

Toutes les méthodes d'immunisation par les virus-vaccins exposent à des accidents; le pourcentage général de ceux-ci est toujours très peu élevé ; il n'est pourtant point négligeable ; de plus les accidents se répartissent très irrégulièrement et, là où ils se produisent, les propriétaires en éprouvent parfois des pertes considérables.

Les mêmes faits s'observent pour les trois affections passibles de la « vaccination » par les virus modifiés : la fièvre charbonneuse, le rouget, le charbon symptomatique.

La vaccination contre le charbon bactéridien est certainement la plus sûre dans ses résultats, et cependant de loin en loin on apprend qu'elle a provoqué une certaine mortalité entre les mains de tel ou vétérinaire expérimenté. Dans un travail d'un haut intérêt et sur lequel nous reviendrons tout à l'heure, Bigoteau a rapporté des exemples frappants de ces fâcheuses surprises [1]. Les mêmes faits s'observent dans tous les « pays à charbon ».

Le charbon symptomatique sembla pendant longtemps échapper à ces vicissitudes. La vaccination est obtenue ici avec une extrême facilité, puisqu'il suffit d'insérer à la queue des matières impures comme les vaccins pulvérulents ou simplement le « suc des tumeurs », comme le fait Thomas, pour immuniser sans danger dans la quasi-totalité des cas. Une plus longue expérience est venue démontrer l'insécurité de l'intervention : le taux des pertes s'est accru subitement en ces dernières années et l'excellence des résultats antérieurs a rendu d'autant plus apparente une défaillance peu alarmante en réalité.

En ce qui concerne le rouget, les accidents consécutifs à la vaccination sont encore plus nombreux. En France, la mé-

1. BIGOTEAU. Sur la pathogénie de la fièvre charbonneuse. *Revue vétérinaire*, 1893, p. 57.

thode pasteurienne ne s'est point répandue comme on pouvait l'espérer, dans la plupart des régions où la maladie sévit en permanence. Les documents que nous possédons montrent que de nombreux essais ont été tentés, mais qu'en beaucoup de points on a renoncé à la vaccination à la suite de quelque échec, bruyamment exploité d'ailleurs par des adversaires inconscients ou intéressés.

Il nous est impossible et il nous paraît inutile d'appuyer par des statistiques cette affirmation de la nocuité possible des vaccinations, et à plus forte raison d'en mesurer l'importance par des chiffres. Le fait est connu et admis par tous. On verra plus loin comment parfois la statistique la plus complète et la plus sincère est inévitablement faussée.

D'où proviennent les accidents constatés? Pourquoi les méthodes qui donnent dans le laboratoire des résultats certains se montrent-elles infidèles dans la pratique? Est-il possible d'éviter ces accidents? Ce sont ces questions complexes que nous nous proposons d'étudier ici.

I

PATHOGÉNIE DES ACCIDENTS POST-VACCINAUX

Un premier point est hors de doute. Les vaccins ne peuvent être incriminés qu'en un très petit nombre de cas. En ce qui concerne les virus-vaccins employés contre la fièvre charbonneuse et le rouget, les procédés d'atténuation permettent de régler la virulence avec une certitude presque mathématique. L'observation montre que des vaccins de même origine provoquent des accidents sur un ou quelques points seulement, alors qu'ils donnent partout ailleurs d'excellents résultats. Très souvent l'opérateur lui-même constate que le même virus employé, le même jour, dans les mêmes conditions, occasionne des pertes dans une exploitation, tandis que rien d'anormal ne se produit dans une autre toute voisine. Enfin, les vaccins éprouvent une petite partie seulement des animaux traités, les autres restant tout à fait indemnes.

Des constatations d'un autre ordre peuvent être faites. Les virus affaiblis peuvent provoquer une évolution virulente chez des animaux, qui, dans le laboratoire, supportent impunément une

inoculation du virus fort. Les bovidés, par exemple, résistent bien à l'inoculation de bactéridies très virulentes pour les autres espèces animales; comment s'expliquer que un quart de centimètre cube d'un virus aussi faible que le premier vaccin, à peine capable de tuer le lapin, puisse causer chez certains bovidés une évolution virulente mortelle ? La même constatation est faite pour le rouget : le porc supporte très bien 2, parfois 5 et 10 c. c. de virus fort sous la peau; comment peut-il succomber à l'inoculation de 1/8 de centimètre cube du virus très atténué qui représente le premier vaccin de Pasteur?

Le charbon symptomatique peut aussi donner lieu à des constatations analogues, bien que les vaccins soient obtenus par une méthode tout à fait différente dans sa technique et dans son inspiration. Le vaccin tue quelques animaux inoculés à la queue alors que d'autres supportent sans faiblir l'inoculation sur le thorax, infiniment plus sévère. Des virus desséchés, chauffés à plus de 100° tuent, tandis que d'autres simplement desséchés sont inoffensifs.

L'hypothèse simpliste d'une évolution déjà commencée au moment de l'inoculation vaccinale n'est admissible qu'en de très rares circonstances. Il est puéril d'invoquer une telle coïncidence alors que la moitié des vaccinés sont affectés en même temps après l'opération. La relation entre les accidents et l'intervention est évidente.

« Ce n'est pas le vaccin qui tue, c'est la vaccination. »

Une conclusion s'impose : les accidents sont dus à des variations dans la réceptivité des vaccinés. Pour expliquer celle-ci, on a invoqué toutes les causes banales de l'étiologie, et leur insuffisance étant manifeste, on s'est livré à d'invérifiables hypothèses. En réalité les accidents sont dus *presque toujours* à une infection *latente* par le virus dont on cherche à neutraliser les effets par la vaccination : celle-ci est l'occasion qui permet l'invasion et l'évolution microbiennes.

I. *Charbon bactéridien*. — Dès 1893, Bigoteau a donné de cette interprétation, en ce qui concerne la fièvre charbonneuse, une démonstration aussi rigoureuse que possible. Ses observations montrent que les accidents sont observés, dans tous les cas, chez des animaux exposés à l'infection, dans les jours qui précèdent la vaccination. « On peut vacciner sans aucune crainte les ani-

maux importés des pays indemnes pendant les six jours qui suivent l'importation ; plus tard, au contraire, ils résistent moins bien que les autres sujets. »

2. *Charbon symptomatique.* — Nous avons pu, en ce qui a trait au charbon symptomatique, faire une série de constatations expérimentales et pratiques qui ne laissent aucun doute sur le rôle des infections latentes dans la genèse des accidents consécutifs à la vaccination.

Rappelons, tout d'abord, qu'il est possible d'obtenir des cultures pures et virulentes de charbon symptomatique, en utilisant le bouillon Martin récemment préparé.

Le chauffage, à diverses températures de cultures sporulées du *bactérium Chauvei*, permet d'obtenir une série de vaccins d'énergies différentes. Outre les avantages qu'ils présentent au point de vue pratique, ces vaccins permettent d'étudier d'une façon précise, le mécanisme de l'immunisation qu'ils procurent et autorisent à établir une comparaison exacte entre les effets de leur inoculation à des animaux sains et à des sujets en état d'infection latente. Il s'agit en effet de vaccins liquides, purs de toute souillure par des bactéries diverses, et dont les propriétés sont toujours rigoureusement comparables à elles-mêmes, à l'encontre de ce que l'on sait des vaccins pulvérulents forcément impurs, variables dans leur composition et par suite irrégulièrement actifs.

On peut inoculer impunément à des animanx de l'espèce bovine, provenant de régions non infectées, des doses considérables de ces virus-vaccins très énergiques, atténués par chauffage à 65° et même seulement à 60°.

Exemples. — Vache n° 6, reçoit le 18 février 1901, en arrière de l'épaule gauche, 3 c. c. de virus atténué à 65° pendant 2 heures. On note à la 48e heure une hyperthermie de 0°,7 ; une petite plaque d'œdème apparaît au point de l'inoculation et disparaît en 40 heures.

Vache n° 5, inoculée le 2 février en arrière de l'épaule gauche avec 3 c. c. de vaccin obtenu par atténuation à 60° seulement. On observe localement une réaction insignifiante sans troubles généraux.

Vache n° 4, inoculée de la même façon que la vache n° 5 ; pas de réaction thermique, réaction locale fugace et très limitée.

Ces vaccins, cependant, sont actifs puisqu'ils provoquent, à la dose de 1 c. c., des accidents locaux non mortels chez le cobaye et qu'ils tuent en 24 heures le mouton, réactif plus sensible au charbon que le cobaye. D'ailleurs, les bovidés qui reçoivent une seule inoculation de ces vaccins résistent à une inoculation d'épreuve très sévère, pratiquée plusieurs jours après la vaccination.

Ces expériences de laboratoire autorisaient pleinement à tenter une application pratique de notre procédé de vaccination. En février 1901, un éleveur éclairé, M. Perrin, ingénieur agronome, nous demandait de vacciner tous les animaux de sa riche exploitation. C'est grâce à son zèle et à sa libéralité que nous avons pu effectuer nos premiers essais de vaccination; qu'il accepte ici l'expression de notre gratitude.

M. Perrin possède dans l'Aveyron un superbe domaine dans lequel il entretient en permanence 50 à 60 bovidés. Il n'a jamais constaté un seul cas de charbon sur ses animaux; par contre, la maladie sévit depuis plusieurs années à 8 ou 10 kilomètres de son exploitation. En octobre 1900, M. Perrin achète 21 animaux Salers dans le Cantal; aucun de ces animaux introduits dans son étable ne contracte le charbon; il achète plus tard à Allanche, dans le Cantal, 16 animaux Salers qu'il place à l'étable à côté du premier lot de 21 sujets.

Deux cas de charbon surviennent le 26 janvier et 7 février dans le lot provenant d'Allanche; un autre propriétaire qui a acheté, le même jour à Allanche, 4 animaux de 12 mois en perd 2 du charbon. Les animaux de cette provenance sont donc contaminés.

Avec des précautions dignes d'éloges et trop rarement prises ailleurs, M. Perrin fait enfouir les animaux morts du charbon et considère, avec raison, comme contaminés les sujets de son dernier achat. Inquiet d'autre part d'avoir chez lui ce foyer d'infection, il décide de soumettre tout l'effectif de son étable à l'inoculation préventive, et nous pratiquons cette opération les 21 et 22 février 1901.

Nous avons utilisé des cultures chauffées à 70° durant 2 heures et éprouvées sur 3 cobayes. Ces animaux ont résisté et n'ont présenté que des lésions peu graves au point d'inoculation. Les expériences rapportées plus haut (effectuées avec des cultures

du virus que M. Perrin nous avait envoyées) nous ayant montré l'innocuité de fortes doses de cultures chauffées à 65° et 60° seulement, nous opérions avec la plus grande prudence en employant du vaccin chauffé à 70° et inoffensif pour le cobaye.

Nous vaccinons donc avec ce virus 38 animaux, savoir :

2 bœufs de 3 ans avec 2 c. c. ;

3 veaux d'un an avec 1, 5 c. c. ;

34 génisses de 2 ans environ avec 1 c. c.

Chez tous les animaux l'inoculation a été pratiquée en arrière de l'épaule. Sur ce total, 24 animaux étaient considérés comme non contaminés puisqu'aucun cas de charbon n'avait été constaté parmi eux, tandis que les 14 autres étaient suspects de contamination comme faisant partie du lot de 16 animaux d'Allanche dans lequel 2 cas de charbon mortel ont été constatés.

L'inoculation a été pratiquée dans des conditions identiques chez tous, avec le même vaccin, la même seringue, la même aiguille. Tandis que les 24 animaux non suspects résistaient à la vaccination, 4 animaux sur 14 du lot contaminé mourraient des suites de l'opération et, chose curieuse, les lésions observées au point d'inoculation étaient nulles, tandis que d'importantes lésions avaient évolué dans la cavité abdominale.

Nous avions ainsi la démonstration que des vaccins, inoffensifs pour le cobaye, inoffensifs aussi pour des bovidés sains, sont dangereux chez des animaux contaminés, en état d'infec, tion latente.

Cet état d'infection latente est donc nettement démontré ; il était aisé de prévoir son existence. Comment expliquer en effet que les animaux de l'espèce bovine deviennent réfractaires au charbon en vieillissant, si l'on n'admet l'existence de petites infections successives chez les sujets qui, entretenus dans les régions infectées ingèrent fréquemment des quantités plus ou moins considérables de spores charbonneuses ?

3. *Rouget du porc.* — Les documents abondent en ce qui concerne le rouget du porc. Une première et sommaire enquête montre que la vaccination pasteurienne fait peu de progrès dans beaucoup de régions où le rouget sévit en permanence et avec le plus de gravité. Cette résistance n'est point due seulement à l'incurie des paysans et la négligence des vétérinaires.

Presque partout des essais ont été tentés. Souvent, après quelques séries heureuses, ou même d'emblée, des accidents sont survenus.

Dans la Corrèze, des séries de « vaccinations » pratiquées à titre de démonstration par les soins de l'administration donnent 10 0/0 de pertes; dans la Haute-Garonne, les résultats sont aussi fâcheux. Au contraire, dans les régions du Nord, où le rouget presque toujours importé ne sévit pas en permanence, la vaccination pasteurienne donne des résultats excellents.

La cause de l'abandon de la vaccination tient aussi au malentendu qui s'établit entre les laboratoires et la pratique. Aux doléances des vétérinaires, les laboratoires répondent toujours dans le même sens: « nos vaccins sont inoffensifs; en dehors des preuves directes que nous avons de leur innocuité, nous savons que le vaccin qui vous a été envoyé a été inoculé sans aucun accident à des centaines d'animaux. Les suites fâcheuses ne peuvent être imputées qu'à une erreur de technique. » L'opérateur renouvelle ses essais avec plus de prudence. Au second échec il abandonne pour toujours une méthode qu'il considère comme dangereuse et qui l'expose à perdre sa clientèle.

Cette fois encore l'observation et l'expérience montrent que les accidents sont imputables à une infection préalable des animaux. On pouvait affirmer *a priori* la présence du bacille chez les porcs entretenus dans les milieux infectés; les recherches de Olt apportent une démonstration directe de ce fait[1].

Tout aussi bien, qu'il s'agisse de fièvre charbonneuse, de charbon symptomatique ou de rouget, la présence passagère, sinon permanente de la bactérie spécifique dans le tube digestif des animaux entretenus dans les régions infectées est indéniable.

L'invasion des tissus, l'évolution virulente n'est épargnée que grâce aux défenses naturelles de l'organisme : conditions chimiques du milieu stomacal ou intestinal et surtout défense phagocytaire.

Si l'organisme, déjà en état de lutte contre une infection par la voie intestinale, est attaqué sur un autre point, même par des agents peu actifs tels que des virus-vaccins, sa défense fléchit

1. Olt, Ueber die regelmässige Vorkommen der Rothlaufbacillen im Darm des Schweines. *Deutsche thierarztliche Wochenscrift*, 1901.

en se divisant, et il a de grandes chances pour succomber au choc de deux légères infections dont il eût triomphé si elles avaient agi séparément. La défense se fait mal, notamment au point d'inoculation et *l'on voit alors un animal inoculé à l'épaule avec du vaccin symptomatique succomber avec des tumeurs absolument généralisées.*

C'est ainsi qu'une évolution « naturelle » de la fièvre charbonneuse, du charbon symptomatique ou du rouget est provoquée par la vaccination. Il n'est point paradoxal de dire que ce n'est pas le vaccin qui tue, mais la vaccination. Malheureusement il est difficile de faire saisir aux paysans intéressés une distinction aussi subtile !

II

PROPHYLAXIE DES ACCIDENTS POST-VACCINAUX

Ces accidents étant dus à une infection latente antérieure, il doit être possible de les éviter en exaltant la puissance défensive de l'organisme.

C'est le but qui est cherché et atteint par les inoculations successives de sérum immunisant et de virus. Pour le charbon symptomatique, l'inoculation préalable du sérum permet à tous les animaux, même à ceux qui sont en état d'infection latente, de supporter le vaccin sans danger.

Nous avons ainsi vacciné déjà plusieurs centaines d'animaux, dans des étables infectées, sans qu'un seul accident se soit produit lorsque le sérum était d'une activité suffisante. Nous ferons connaître très prochainement les expériences réalisées.

La démonstration est complète en ce qui concerne le rouget du porc. On peut vacciner sans dangers les sujets appartenant à des effectifs gravement contaminés, à cette condition de les soumettre tout d'abord à une inoculation de sérum pur. Non seulement celle-ci répond à une indication immédiate : éviter une évolution probable ou certaine, mais elle permettra en outre d'intervenir quelques jours plus tard par la vaccination.

La sensibilité des organismes infectés est telle que non seulement les virus atténués, mais les séro-vaccins (mélange de virus et de sérum immunisant) ne peuvent être employés sans danger

dans les milieux contaminés. Les quelques accidents, constatés avec la séro-vaccination, sont observés toujours sur des animaux que L'ON REGARDAIT A TORT COMME INDEMNES DE CONTAMINATION; au contraire, des porcs CERTAINEMENT INFECTÉS supportent sans danger soit la vaccination pasteurienne, soit le séro-vaccination, *s'ils ont reçu au préalable une injection de sérum.*

Les résultats obtenus avec le rouget et le charbon symptomatique par l'inoculation du sérum, pratiquée avant la vaccination des animaux, entretenus dans les régions infectées, est une démonstration indirecte du rôle et de l'importance des infections latentes dans la genèse des acccidents post-vaccinaux.

Ces inoculations agissent en exaltant la phagocytose qui débarrasse alors l'organisme des germes qu'il recèle.

On voit disparaître dès ce moment ces oppositions étranges entre les résultats expérimentaux et ceux de la pratique. On ne voit plus succomber à l'inoculation d'une dose insignifiante d'un virus à peine actif, des animaux qui, en d'autres conditions, supportent impunément une dose vingt fois supérieure d'un virus exalté.

L'association de la sérothérapie et de la vaccination est indispensable pour une catégorie déterminée de sujets. Les deux méthodes se compléteront l'une par l'autre à tous égards. Le sérum assurera en quelques instants l'immunisation que les vaccins eussent assurée trop tard; le sérum garantira l'innocuité de la vaccination.

Nous croyons avoir apporté la preuve de ces faits en ce qui concerne le charbon symptomatique et le rouget du porc; nous essaierons de la fournir pour la fièvre charbonneuse.

*
* *

L'emploi des sérums ne permettra pas cependant d'éviter à coup sûr tous les accidents post-vaccinaux. A côté des accidents mortels, résultat d'une infection par le microbe dont on cherchait à neutraliser les effets, il peut s'en produire d'autres provoqués par un agent bien différent. Nous montrerons plus loin qu'à la suite de vaccination contre le rouget, les animaux peuvent succomber à la pasteurellose.

Ici encore il semble que c'est la vaccination qui est l'occasion de l'évolution virulente; il n'est pas illogique de penser que

l'organisme est particulièrement impressionné par la vaccination. Ce qui le prouve, c'est qu'une inoculation virulente, inoffensive dans les conditions ordinaires, ébranle vivement un animal vacciné depuis trop peu de temps ; dans les jours qui suivent la vaccination, la phagocytose doit s'exercer aussi d'une façon particulièrement élective à l'égard du virus inoculé et devenir ainsi moins vive, plus paresseuse dans la lutte contre d'autre germes.

Il se passe sans doute là quelque chose d'analogue à ce que l'on observe dans la si curieuse expérience de Roger sur l'inoculation simultanée au lapin de *B. Chauvæi* et *M. prodigiosus* On sait que normalement le lapin peut être considéré comme réfractaire au charbon symptomatique, car les bactéries spécifiques inoculées à cet animal sont aussitôt phagocytées ; mais si l'on inocule, en même temps que celles-ci, un microbe banal, le *M. prodigiosus*, les phagocytes absorbent celui-ci, négligeant le *B. Chauvæi;* le charbon peut alors évoluer chez le lapin.

On voit, d'après ce qui précède, que la matière est d'une difficulté et d'une complexité extrêmes. On ne peut qu'admirer l'audace des savants qui lancent des méthodes nouvelles basées sur quelques tentatives heureuses dans le laboratoire. Il faut être cent fois sûr de ses procédés avant que de les exposer au contrôle de la pratique. Même en ces conditions on ne peut attendre sans angoisse la confirmation des prévisions les plus autorisées !

L'exemple suivant est intéressant à plus d'un titre : au cours de séro-vaccinations contre le rouget pratiquées dans le Cher, l'un de nos meilleurs collaborateurs constate des séries d'accidents à la suite de l'intervention. Quelques porcs succombent en des temps variables; certains présentent les signes d'un rouget authentique; d'autres, des troubles un peu différents; les accidents atteignent non seulement des animaux ayant reçu d'emblée le séro-vaccin, mais aussi ceux qui ont été traités au préalable par le sérum.

L'examen des rates envoyées montre qu'en tous les cas, les animaux ont succombé à cette forme de pneumo-entérite que Lignières a démontré être due à la pasteurella.

Depuis, les mêmes faits ont été constatés sur divers points. Dans l'Ariège, le rouget éclate dans un grand élevage ; on vaccine un certain nombre de sujets. Après l'opération plusieurs animaux

tombent malades ; ils sont essoufflés ; l'un d'entre eux succombe. Les vicères renferment en abondance la pasteurella.

Ici encore l'interprétation n'est pas douteuse. Il est évident que les accidents sont le fait de la vaccination, ils doivent être imputés à son passif. Les porcs succombent parce que vaccinés; il est à peu près certain qu'ils n'eussent présenté sans cela aucun accident. L'injection du vaccin, en diminuant la résistance de l'organisme, permet à la pasteurella, hôte normal en certaines régions des voies respiratoires ou digestives, de provoquer une infection mortelle.

On a là l'explication de certains faits. Maintes fois les viscères de porcs ayant succombé après la vaccination pasteurienne ont été adressés à des laboratoires qui ont fait cette réponse : « Le porc a succombé à la pneumo-entérite. Le vaccin n'a rien à faire par conséquent en l'espèce. » Le vétérinaire, non plus que le propriétaire, ne parvenait à s'expliquer comment la pneumo-entérite survenait au moment précis de la vaccination, tuant seulement les vaccinés, épargnant tous les autres dans le même étable et dans le voisinage. Les conséquences de ces à-coups sont faciles à prévoir : on cesse désormais de vacciner.



Ainsi l'emploi du sérum ne supprimera pas tous les accidents post-vaccinaux ; ce qui se produit pour le rouget pourra se reproduire pour les affections charbonneuses : on pourra aussi voir des moutons ou des bovidés vaccinés contre la fièvre charbonneuse succomber à des affections pasteurelliques. Mais on aura supprimé au moins la principale cause des accidents.

D'autre part, on sera prévenu de l'éventualité de défaillances qui n'auront plus rien de mystérieux, et c'est en pleine connaissance de cause que les praticiens interviendront.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DES FIXATEURS DU SÉRUM NORMAL DE CHIEN

Par E. MALVOZ.

Dans leur beau mémoire sur les sensibilisatrices ou fixateurs des sérums antimicrobiens[1], MM. Bordet et Gengou disent n'avoir pas décelé ces substances dans les sérums neufs des animaux témoins qui ont servi à leurs expériences. C'est ainsi que le sérum antipesteux, préparé chez le cheval, est très riche en sensibilisatrices spécifiques, alors que le sérum normal de cet animal ne révèle pas de fixateurs pour le bacille pesteux. Le cobaye injecté de vaccin du charbon fournit un sérum sensibilisateur pour ce microbe, mais le sérum neuf de cobaye se montre totalement dépourvu de cette propriété. Et de mêm poure le bacille typhique, le proteus, etc., vis-à-vis desquels les sérums normaux ne manifestent pas de propriété sensibilisatrice.

Cette question des fixateurs des sérums normaux présente un grand intérêt au point de vue des doctrines générales de l'immunité : en ce qui concerne particulièrement l'état réfractaire naturel de certains animaux, il est très important d'établir si la défense est due aux seules alexines ou si celles-ci ont besoin du concours des substances sensibilisatrices, comme chez les animaux immunisés. Les observations publiées, jusqu'à présent, de fixateurs dans les sérums neufs sont fort clairsemées.

Dans son mémoire sur l'agglutination et la dissolution des hématies[2], Bordet s'est déjà demandé si dans les sérums neufs, l'action de l'alexine n'était pas favorisée par celle d'autres matières. En combinant l'action de 2 sérums neufs, il put constater des faits qui ne s'expliquaient bien que par la présence de fixateurs. Ainsi, les vibrions cholériques, qui ne subissent de transformation granuleuse ni dans le sérum de cheval neuf ni dans celui du cobaye normal, se transforment facilement en granules lorsqu'on les met en contact du mélange des deux sérums. Mais

1. *Annales Pasteur*, mai 1901.
2. *Annales Pasteur*, 1899, p. 295.

Bordet faisait toutes ses réserves quant à une généralisation hâtive de cette observation.

Tout récemment, Wechsberg[1], discutant certaines expériences de Wasserman, sur l'action des anticompléments chez les cobayes injectés de bacilles typhiques et se livrant à un contrôle de celles-ci, découvre que le sérum neuf chauffé de lapin doit renfermer des ambocepteurs (sensibilisatrices) pour le bacille typhique, n'agissant bien qu'avec le concours de l'alexine, non de lapin, mais de cobaye. Pfeiffer[2], de son côté, a signalé des sensibilisatrices pour le vibrion cholérique dans le sérum normal de chèvre.

Nous venons, de notre côté, de découvrir que le sérum normal de chien renferme des fixateurs pour le bacille du charbon, ou tout au moins que si on soumet du sérum de cet animal à la série d'essais qui, dans les mains de Bordet et Gengou, ont permis la découverte de fixateurs dans les sérums antimicrobiens, le sérum de chien se comporte tout à fait comme celui d'un animal tel que le cobaye qui aurait été traité par des microbes du charbon.

Nous sommes arrivé à cette constatation d'une manière indirecte, au cours d'une étude que nous faisions sur les causes du pouvoir bactéricide du sérum de rat vis-à-vis du charbon. Ce pouvoir microbicide, on le sait, est tout particulier : il ne disparaît pas, notamment, à la suite d'un chauffage du sérum à 56°. Est-il dû à une alexine ? Non, d'après Bordet.

Pour élucider la question, nous voulions rechercher si l'injection de ce sérum chauffé, de rat à d'autres animaux serait suivie de l'apparition de substances antibactéricides (antialexines, antisensibilisatrices ?) dans leur sérum. Il fallait s'assurer d'abord que l'animal choisi pour ces injections ne présenterait pas lui-même dans son sérum des substances agissant comme anti-alexines ou antisensibilisatrices vis-à-vis du charbon. On sait que certains sérums *neufs* renferment des anticorps tels que les antitoxines diphtérique et tétanique (cheval), l'antistaphylotoxine (homme), l'anticrotine (porc), des antiferments (antiprésurs, antithrombase, anticynarase); le sérum de chèvre renferme une antisensibilisatrice contre l'hémolysine des hématies de chèvre

1. *Zeitschrift für Hygiène*, vol. 39, fasc. 1, p. 183 et s.
2. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, n° 51, 1901, p. 892.

(Ehrlich), etc. Or, en soumettant le sérum neuf de chien aux divers essais préalables qu'il fallait instituer pour déterminer notre choix, nous avons vu que, bien loin de renfermer des substances antialexiques ou antisensibilisatrices par égard au microbe du charbon, ce sérum se comporte comme s'il contenait, en abondance, des fixateurs spécifiques pour cette espèce bacillaire.

Voici les essais variés qui nous paraissent établir ce fait :

C'est la méthode Bordet-Gengou qui a été appliquée dans ces expériences ; chaque série dont l'exposé suit a été faite sur les vaccins I et II de l'Institut Pasteur, sur le bacille du charbon virulent, et sur un bacille atténué par des cultures en phénol qui nous avait été très obligeamment fourni par le Dr Malfitano.

Au moyen de cultures fraîches sur gélose à 37°, on prépare d'abord des émulsions très concentrées du microbe en eau salée à 9 0/0 ; puis dans de tout petits tubes à essai on introduit les mélanges suivants :

1° Émulsion de microbes, 4 gouttes ; sérum normal de chien adulte chauffé à 56° une demi-heure, 12 gouttes ; alexine fraîche de lapin, 2 gouttes. On laisse 6 heures en contact à la température de la chambre, puis on ajoute 2 gouttes d'hématies de poule bien lavées et sensibilisées par du sérum chauffé à 56° provenant d'un lapin injecté à 3 reprises avec du sang défibriné de poule ;

2° Même mélange que 1°, mais dans lequel le sérum chauffé de chien est remplacé par du sérum normal chauffé de cobaye ;

3° Même mélange que 1°, mais avec sérum normal de bœuf chauffé ;

4° Même mélange que 1°, mais sans microbes ;

5° Même mélange que 1°, mais où l'alexine fraîche de lapin est remplacée par de l'alexine de rat ;

6° Même mélange que 5°, mais où le sérum chauffé de chien est remplacé par de l'eau physiologique ;

7° Même mélange que 1°, mais où l'alexine fraîche de lapin est remplacée par de l'alexine de cobaye ;

8° Même mélange que 7°, mais où le sérum de chien est remplacé par de l'eau physiologique ;

9° Même mélange que 1°, mais où le sérum normal de chien chauffé est remplacé par de l'eau physiologique ;

10° Même mélange que 1°, mais où le microbe du charbon est remplacé par le *bacillus mycoïdes;*

11° Même mélange que 1°, mais où le microbe du charbon est remplacé par le *bacillus mesentericus;*

12° Même mélange que 1°, mais où le microbe du charbon est remplacé par le bacille de Friedländer.

Tous ces mélanges sont placés pendant une heure à 37°, puis abandonnés jusqu'au lendemain à la température de la chambre.

Le résultat est frappant: il n'y a pas d'hémolyse dans les mélanges où le sérum normal de chien chauffé se trouve en présence d'une part, des microbes, d'autre part, de l'alexine de lapin, de cobaye ou de rat; tous les autres mélanges présentent une forte hémolyse des hématies.

L'examen microscopique confirme le résultat macroscopique; l'hémolyse, là où elle existe, se caractérise par la destruction des hématies dont on ne voit plus que les noyaux.

Le résultat est surtout très net quand il s'agit du vaccin et du charbon atténué par le phénol; parfois dans les mélanges où se trouve le charbon virulent, on trouve quelques hématies détruites.

Dans les tubes où le sérum de chien était remplacé par du sérum chauffé de cobaye ou de bœuf, l'hémolyse s'est produite aussi rapidement que dans les témoins, renfermant seulement de l'alexine, de l'eau physiologique et des microbes. Tout se passe donc comme si le sérum normal de chien renfermait des fixateurs pour le bacille du charbon, n'agissant pas sur d'autres microbes.

On remarquera que les hématies employées étaient des globules de poule sensibilisés par du sérum chauffé lapin-poule; nous avons pu nous assurer — comme Bordet l'avait fait déjà — que l'on peut hémolyser ces hématies sensibilisées aussi bien par l'alexine fraîche de cobaye de rat ou de chien que par celle du lapin. Pourquoi n'avons nous pas employé l'alexine de chien dans tous les mélanges précités? C'est qu'il suffit d'ajouter, au mélange de 4 gouttes d'émulsion de charbon et de 12 gouttes d'eau physiologique, 2 gouttes de sérum frais de chien pour obtenir un liquide incapable d'hémolyser les hématies sensibilisées de poule : il est vraisemblable que les fixa-

teurs présents dans cette petite quantité de sérum frais de chien suffisent pour fixer l'alexine sur les bacilles.

Quand, au lieu de sérum normal chauffé de chien comme source des sensibilisatrices, on emploie le sérum de lapin chauffé, les résultats sont variables : certains lapins nous ont fourni un sérum dépourvu de fixateurs; dans d'autres cas, le sérum paraissait renfermer une certaine proportion de sensibilisatrices, mais le phénomène était toujours moins net qu'avec le sérum de chien.

On remarquera aussi que les mélanges où le sérum de chien chauffé se trouvait seul en présence de l'alexine, sans bacilles du charbon, détruisaient parfaitement les hématies sensibilisées de poule; on ne peut donc expliquer nos résultats par la présence, dans le sérum de chien, de l'une ou l'autre substance s'opposant à l'action de l'alexine : il faut la présence de microbes du charbon pour fixer la sensiblisatrice et après celle-ci l'alexine.

Des essais d'un autre genre viennent encore plaider en faveur de l'existence de sensibilisatrices du charbon dans le sérum du chien.

On prépare une émulsion, très concentrée en eau physiologique, de bacilles du charbon (variété atténuée par le phénol). On introduit dans 2 petits tubes, et dans chacun d'eux (A,A') 6 gouttes de cette émulsion qu'on additionne ensuite de 6 gouttes de sérum normal de chien chauffé. Tandis que le tube A' sert de témoin, le mélange A, après un repos de 6 heures, est soumis à l'action de la turbine pendant 1 heure, puis on enlève avec beaucoup de précaution, au moyen d'une fine pipette le liquide, qui surnage et on l'introduit dans un tube B Nous ajoutons 2 gouttes d'alexine fraîche de lapin à la fois à B. et à A' (A' contient encore les bacilles du charbon ; B n'en contient plus). On abandonne au repos pendant quelques heures, puis à B et a A' on ajoute des hématies de poule sensibilisées par du sérum chauffé lapin-poule (on fait en même temps des témoins avec alexine de lapin, eau salée et hématies sensibilisées). Après 2 heures à 37°, on constate que les hématies sont hémolysées dans le témoin et dans B. mais sont restées intactes dans A', où il ne se produit pas de destruction des globules.

L'interprétation de ces résultats est facile si l'on admet la

présence de fixateurs dans le sérum normal de chien. Ce sérum chauffé, dépouillé de ces substances par l'addition d'une grande quantité de bacilles du charbon et débarrassé ensuite des microbes sensibilisés, laisse l'alexine, ajoutée ensuite, parfaitement libre, tandis qu'en présence des bacilles impressionnés, l'alexine se fixe fortement sur ces derniers.

Dans toutes les expériences qui viennent d'être relatées, on a fait usage du sérum de grands chiens adultes. Si, par les mêmes méthodes, on recherche la présence de fixateurs dans le sérum de jeunes chiens, les résultats sont négatifs. Nous avons pris du sang d'un chien âgé de 15 jours : chauffé 1/2 heure à 56°, le sérum ne fixe sur les vaccins et sur le charbon virulent, ni l'alexine de chien ni celle de lapin ou de cobaye.

L'alexine de ce jeune chien était nettement hémolytique pour les hématies sensibilisées de poule.

Si, au lieu d'opérer sur le sérum de chien, on recherche par ces méthodes les fixateurs éventuels du sérum normal de rat, on obtient des résultats négatifs. Si on prend, par exemple, des microbes du charbon ou du vaccin charbonneux, mélangés à du sérum normal de rat préalablement chauffé à 56° et additionnés d'alexine de lapin, ou de cobaye dans les conditions habituelles de ces expériences, on n'observera pas de sensibilisation des bacilles : l'alexine reste libre et capable d'hémolyser, aussi fortement que les témoins où le sérum de rat est remplacé par de l'eau physiologique, les hématies sensibilisées de poule. Le résultat est le même si, au lieu d'alexine de lapin ou de cobaye, on se sert d'alexine de rat, qui elle aussi détruit parfaitement les globules de poule sensibilisés par le sérum lapin-poule.

Mais si nous ne constations l'absence de sensibilisatrices des bacilles du charbon, en présence du sérum de rat chauffé, qu'en nous servant de l'alexine de rat le résultat resterait douteux. En effet, le sang de rat est tout différent de celui des autres animaux. Son pouvoir bactéricide ne disparaît pas après un chauffauge à 56°, alors que le sérum de lapin, souvent bactéricide pour le charbon, n'est plus actif après avoir été soumis à cette température. Au contraire, l'alexine hémolytique de rat, ainsi que nous l'avons constaté, ne résiste pas à un chauffage à 56°, c'est-à-dire que le sérum

frais de rat ainsi chauffé n'est plus capable d'hémolyser les hématies sensibilisées de poule. Bordet[1] avait déjà signalé que le sérum de rat chauffé à 56° perd l'alexine capable de provoquer le phénomène de Pfeiffer sur les vibrions sensibilisés par le choléra-sérum. Il y a donc dans le sérum de rat deux substances actives très différentes : une alexine, semblable à l'alexine des deux autres sérums neufs, et une autre substance, qui n'est peut-être pas une alexine, douée de propriétés bactéricides et résistant à 56°. Même si une hémolyse se produisait dans les mélanges de bacilles du charbon, de sérum de rat chauffé et de sérum frais de rat, additionnés d'hématies sensibilisées de poule, on ne pourrait donc pas en conclure que le sang de rat ne renferme pas de fixateurs pour le charbon, l'alexine hémolytique étant différente de la substance bactéricide. Mais l'expérience faite avec l'alexine de lapin ou de cobaye permet de conclure à l'absence de sensibilisatrices, tout au moins à la quantité incomparablement inférieure de celles-ci par rapport au sérum de chien, dans le sérum de rat chauffé à 56°.



Il est impossible de ne pas être frappé de ce fait qu'il existe une relation entre l'existence ou l'absence de fixateurs pour le bacille du charbon dans les divers sérums que nous avons étudiés et la sensibilité des animaux correspondants à l'infection charbonneuse.

Le chien adulte est considéré comme l'animal le plus réfractaire au charbon; or, son sérum paraît contenir des fixateurs spécifiques en abondance. Le chien nouveau-né est beaucoup plus sensible au charbon que l'adulte : son sérum est dépourvu de sensibilisatrices spécifiques.

Le cobaye, le bœuf, animaux sensibles, ont un sang dépourvu de ces sensibilisatrices. Le lapin, qui présente parfois une certaine résistance au charbon virulent et en tout cas ne succombe pas au premier vaccin, manifeste dans certains cas des propriétés sensibilisatrices de sérum vis-à-vis de la bactéridie.

Reste le cas du rat : bien que son sang *in vitro* soit très bactéricide pour le charbon, il est admis aujourd'hui que cet

1. *Annales Pasteur*, 1899, page 291.

animal n'est nullement réfractaire au charbon; que, bien au contraire, si au moment de l'injection de bacilles, on sait éviter l'action bactéricide du sang extravasé, le long de la piqûre, le rat devient très sensible à l'infection. Or, son sérum ne paraît pos renfermer de sensibilisatrices spécifiques pour le microbe du charbon.

C'est à se demander si ce pouvoir bactéricide *in vitro* des sérums normaux vis-à-vis du charbon n'est pas une propriété accidentelle n'ayant rien à faire avec la défense de l'organisme vivant. En effet, le sérum de chien n'est pas bactéricide *in-vitro* pour le charbon, et cet animal est beaucoup plus réfractaire que le rat! Et cette absence de pouvoir bactéricide dans le sérum de chien n'a pas laissé d'embarrasser beaucoup ceux qui ont fait de ce phénomène la base de leur explication de l'état réfractaire. Mais la présence de fixateurs spécifiques vient jeter une nouvelle lumière sur les causes de l'immunité naturelle du chien vis-à-vis du charbon. Ces fixateurs ne suffisent pas, même avec l'aide de l'alexine normale du chien, pour tuer les bacilles du charbon en dehors du corps dans le sang extravasé!

Mais dans l'organisme vivant où les conditions sont toutes différentes, ces fixateurs doivent favoriser énergiquement l'action des alexines contenues dans les phagocytes et qui sont autrement puissantes que celles qui s'échappent des globules blancs pendant la coagulation du sang *in vitro*.

Nous avons essayé, mais sans avoir réussi jusqu'à présent, de détruire les bacilles du charbon *in vitro* au moyen de sérum chauffé de chien réactivé par des alexines autres que celles du chien (cobaye, par exemple). Il ne faut pas perdre de vue que les sérums d'animaux les plus fortement immunisés contre les microbes pathogènes, contenant de grandes quantités de sensibilisatrices spécifiques, ne sont guère bactéricides *in vitro*, sauf pour le cas de microbes très fragiles tels que le vibrion cholériques.

Les espèces microbiennes résistantes, même sensibilisées par les fixateurs spécifiques, ne semblent pouvoir être bien détruites qu'à l'intérieur des phagocytes vivants grâce aux alexines élaborées par ceux-ci.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

16me ANNÉE 25 SEPTEMBRE 1902 N° 9

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR QUELQUES BACILLES ANAÉROBIES ET LEUR DIFFÉRENCIATION

Par Pierre ACHALME.

La différenciation et la délimitation des espèces microbiennes sont au nombre des problèmes les plus difficiles de la bactériologie. Dès que l'on se trouve ou que l'on croit se trouver en présence d'une espèce nouvelle, on est frappé de l'insuffisance des moyens que l'on possède pour la caractériser, en même temps que des analogies qu'elle présente avec d'autres espèces certainement distinctes, mais dont la définition incomplète est susceptible de créer des confusions souvent impossibles à éviter.

Si le microbe étudié présente une virulence à peu près fixe, quelque relative que soit la valeur de la fonction pathogène, on trouve en elle un auxiliaire précieux. Mais si au contraire la virulence est nulle ou varie, comme on l'oberve souvent, dans de grandes proportions, et cela dans des conditions difficiles à définir, la fonction pathogène doit être forcément reléguée au second plan.

Je n'ai jamais mieux ressenti ces difficultés que lorsque j'ai voulu préciser les caractères du bacille que nous croyons être l'agent pathogène du rhumatisme articulaire aigu. Le caractère des lésions qu'il provoque chez les animaux, sa nature anaérobie, les diastases tryptiques qu'il sécrète, le rapprochaient évidemment du vibrion septique et du bacille du charbon symptomatique, dont il se différenciait par les caractères de sa culture sur lait et la difficulté avec laquelle il sporule sur les milieux habituels. D'autre part, l'inconstance relative de ses effets pathogènes et les chutes brusques de virulence

qu'il présente permettaient de le confondre avec des espèces peu pathogènes comme le *Bacillus putrificus coli* (*Bienstock*) et certains tyrothrix présentant la même action sur les substances albuminoïdes.

J'ai donc pensé faire œuvre utile en étudiant, par une technique simple et en dehors de leurs effets pathogènes, un certain nombre d'espèces anaérobies bien caractérisées, et en créant une sorte de cadre où pourraient venir prendre leur place des espèces voisines ultérieurement déterminées par les mêmes moyens.

Les bacilles que nous avons ainsi étudiés ont été, pour la plupart, mis gracieusement à notre disposition par M. Binot, conservateur du musée de l'Institut Pasteur.

1° Vibrion septique. A, de la collection de l'Institut Pasteur;

B, de la collection de la Faculté de médecine.

2° Bacille du charbon symptomatique. A, de la collection de l'Institut Pasteur;

B, dû à l'amabilité de M. Vallée, de l'école vétérinaire de Toulouse.

3° Bacille du tétanos. A, de la collection de l'Institut Pasteur;

B, de la collection de l'École de médecine.

4° Bacille du botulisme (Van Ermenghem) de la collection de l'Institut Pasteur,

5° *Bacillus putrificus coli* (Bienstock) de la collection de l'Institut Pasteur.

6° Bacille connu sous le nom de bacille d'Achalme, trois échantillons provenant de myocardes de rhumatisants.

7° *Bacillus enteritidis sporogenes* (Klein), échantillon dû à l'amabilité de M. Hewlett, du Jenner's Institut, de Londres.

8° *Bacillus perfringens* (Veillon), échantillon dû à l'amabilité de M. Rist.

9° Bacille isolé de l'eau de Seine par Legros (pages 68 et 69 de sa thèse) et donnant lieu à une gangrène gazeuse chez le cobaye.

10° Comme point de comparaison, bien qu'il s'éloigne considérablement par ses propriétés biologiques des espèces précédentes, j'ai cultivé le *Bacillus orthobutylicus* de Grimbert, si méthodiquement étudié par cet auteur. Je signalerai au cours de ce travail quelques particularités nouvelles de ce microorganisme; mais les descriptions générales ne se rapportent pas à lui

particulièrement en ce qui concerne la sécrétion de trypsine et la sporulation.

Morphologie. — La morphologie des bactéries a déjà bien perdu de sa valeur en ce qui concerne les microbes aérobies; mais elle n'est absolument d'aucun secours pour différencier entre eux les microbes anaérobies étudiés.

La forme, le diamètre, la longueur des bâtonnets, leur rapport entre eux, la forme arrondie ou carrée de leurs extrémités, sont tellement variables, suivant les milieux, qu'on ne saurait vraiment fonder sur ces caractères aucune distinction utile. Le *Bacillus putrificus coli*, par exemple, après sept jours de culture, se présente en effet sous l'aspect suivant :

Sur le milieu blanc d'œuf galactosé, longs filaments non sporulés, indépendants les uns des autres; sur le même milieu maltosé, filaments enchevêtrés formant des grumeaux, pas de spores; sur glucose, petits bâtonnets grêles sans spores; sur amygdaline, formes très courtes, en chapelets simulant des chaînettes de streptocoque; sur saccharose, gros bâtonnets sporulés; sur dulcite, spores isolées, sans vestiges de bâtonnets.

Il en est de même des autres espèces, bien qu'elles présentent en général des variations un peu moins étendues. Sur des milieux plus complexes, tels que le bouillon, on observe des différences sensibles dans la forme du microbe, suivant que le milieu est plus ou moins fraîchement préparé, la température de la culture plus ou moins élevée, le vide plus ou moins rigoureux. La moindre gêne dans le développement a pour résultat la formation de formes involutives très diverses. Tout essai de distinction basé sur la morphologie de ces espèces repose donc sur un caractère par trop fragile.

Mobilité. — La mobilité, lorsqu'elle existe, peut avoir une certaine valeur, mais seulement comme caractère d'appoint. Le bacille tétanique, le vibrion septique, le bacille du charbon symptomatique sont les plus mobiles des microbes étudiés. Néanmoins, on peut observer chez tous quelques mouvements pendant une période plus ou moins brève de leur existence.

Quant à l'époque précise de cette mobilité, elle est elle-même variable. On a bien dit que le bacille tétanique s'immobilisait au moment de l'apparition de la spore; d'autre part, j'ai remarqué qu'à ce moment, au contraire, le bacille que j'ai

décrit présente des mouvements très accusés, alors qu'il est le plus souvent immobile aux autres périodes de son évolution. Mais là encore on ne trouve rien de suffisamment constant. J'ai souvent vu en effet des bacilles tétaniques, sporulés, présentant la forme classique en baguette de tambour, animés de mouvements propres aussi marqués que des bâtonnets non sporulés.

Réactions colorantes. — La manière dont se comporte le corps microbien, vis-à-vis de certains colorants, présente une grande importance, lorsqu'il s'agit de différencier rapidement les unes des autres des espèces microbiennes relativement éloignées par l'ensemble de leurs caractères biologiques. Il n'en est plus de même lorsqu'il s'agit de microorganismes aussi prochainement parents que les espèces étudiées. Tous se montrent très avides des matières colorantes, les retiennent assez vivement, mais se décolorent sous l'influence des acides forts. La méthode de Gram n'est elle-même d'aucune utilité. Tous restent colorés par elle, mais mal, irrégulièrement et seulement lorsqu'il sont jeunes. La modification apportée par Claudius (acide picrique au lieu de solution iodo-iodurée) donne de beaucoup meilleurs résultats. La coloration est franche, homogène, bien nette même dans les formes involutives. Les résultats de cette coloration, opposés aux effets incertains de la méthode de Gram, sont un bon signe de diagnostic différentiel du groupe, mais ne peuvent permettre d'établir aucune différence entre les espèces qui le composent.

Aspect des colonies sur milieux solides. — D'une utilité incontestable au point de vue de la séparation et de la purification des germes anaérobies, les cultures sur milieux solides et spécialement sur gélose, glucosée ou non, ne sauraient fournir aucun signe différentiel utile. La grosseur des colonies est en général en raison inverse de leur nombre, par suite de la gène qu'elles exercent les unes sur les autres, gêne due à l'excrétion de substances nuisibles; il est donc impossible d'en tirer aucune indication. Leur forme est aussi des plus variables. Habituellement sphériques, elles s'entourent parfois d'une auréole nuageuse ou de rayons divergents; mais toutes les espèces étudiées peuvent présenter cet aspect, qui est plutôt en relation étroite avec la composition et surtout la consistance du milieu.

Sporulation. — La production de spores est au nombre des

plus capitales fonctions des microorganismes. Il est donc d'une très grande importance de déterminer avec soin les circonstances dans lesquelles un bacille sporule et les modifications que subit le bacille du fait de cette sporulation. En dehors de sa valeur au point de vue du diagnostic différentiel, la production de spores permet, en général, un isolement facile et une longue conservation ; elle présente en outre un intérêt spécial au point de vue de la fixation des caractères de l'espèce. De même que, lorsqu'il s'agit de végétaux supérieurs, la reproduction par graines, opposée à celle par bouture, a pour résultat d'éliminer les qualités temporairement acquises, pour ne conserver, au bout de quelques passages, que les caractères fondamentaux de l'espèce, de même on peut considérer comme réellement fixées, pour un même microbe, les propriétés fermentatives, pathogènes, etc., qui résistent à un certain nombre de sporulations consécutives sur un milieu indifférent.

En ce qui concerne les espèces étudiées, sauf le *bacillus orthobutylicus*, qui se montre moins exigeant, la moindre acidité du milieu constitue une condition très défavorable à la production des spores. Or comme, d'autre part, cette acidité du milieu est due le plus souvent aux fermentations produites par le microbe lui-même, principalement aux dépens des hydrates de carbone, cette sporulation se trouve donc sous la dépendance étroite de la composition du milieu de culture, et ne se produit que si ce dernier ne contient pas de substances transformables en acide par le microbe étudié. L'étude des fermentations produites par chaque espèce microbienne est donc, à ce point de vue, d'une importance capitale, et, inversement, la sporulation ou la non-sporulation sur un milieu déterminé peut fournir une indication utile sur les transformations chimiques résultant du développement microbien.

D'autre part, avant d'affirmer qu'un microbe de ce groupe ne produit pas de spores, il est nécessaire de le faire développer sur un milieu ne contenant pas de substance hydrocarbonée fermentescible. Cela n'est pas, pour certaines des espèces précédentes, aussi facile que l'on peut le croire. Le bouillon de viande ordinaire contient, en dehors d'une petite quantité d'inosite, une quantité de glycogène variant entre 3 et 4 grammes par litre, pouvant produire par sa fermentation une

acidité assez considérable pour s'opposer à la production de spores. Il en résulte que les bacilles ayant la propriété de faire fermenter le glycogène (bacille d'Achalme, *bacillus enteritidis sporogenes*, *bacillus perfringens*, etc.) ne sauraient sporuler sur ce milieu dont l'emploi se trouve restreint aux espèces assez nombreuses qui laissent le glycogène intact. Il est donc nécessaire de préparer pour ces microorganismes des milieux nutritifs purement azotés. Je reviendrai plus loin sur leur choix et leur préparation.

Quant aux différentes formes que présentent les bacilles au moment de la sporulation, elles présentent des caractères assez nets pour que Kruse (traité de Flügge) ait cru trouver en elles une base scientifique de classification de ces microorganismes.

Pour lui, on doit considérer trois types : le type œdème-bacille (vibrion septique), dans lequel la spore apparaît à l'intérieur du bâtonnet sans le déformer ; le type bacille du charbon symptomatique, ayant pour caractère une déformation du corps bacillaire en fuseau (*Spindel*) ou en massue (*Keulen*); enfin le type bacille du tétanos, présentant au moment de la sporulation l'aspect classique en baguette de tambour (*Trommelschlagel*) ou en épingle (*Stecknadel*). Ainsi présentée, la classification peut être utile en ce sens qu'elle est l'expression des faits les plus fréquemment observés. Mais l'auteur lui-même reconnaît que les transitions et les exceptions sont nombreuses, ce qui en atténue singulièrement la rigueur. Si, du reste, on analyse la signification de ce caractère différentiel, on voit qu'il est basé sur le rapport entre le volume de la spore, élément à peu près invariable, et la largeur du bâtonnet, élément au contraire très variable, non seulement suivant les espèces, mais encore selon les milieux.

En outre, le moment de l'observation joue aussi un grand rôle dans l'aspect du bacille sporulé ; le corps bacillaire, en effet, disparaît plus ou moins rapidement après l'apparition de la spore, et présente une réduction progressive de son diamètre pouvant, dans toutes les espèces étudiées, produire les formes invoquées comme caractéristiques.

On ne peut non plus baser aucun signe différentiel sur le siège médian ou terminal de la spore, ce caractère n'offrant pas

une constance absolue, excepté peut-être en ce qui concerne le bacille tétanique.

La forme de la spore est plus constante; celle du bacille tétanique est plutôt sphérique alors que celle des autres bacilles étudiés est nettement ovoïde; mais il s'agit là d'une appréciation souvent bien délicate.

En résumé, tout en étant beaucoup plus intéressante que ceux fournis par la morphologie des bacilles ou des colonies, les faits résultant de l'observation de la sporulation ne sont pas suffisants pour servir de base à une différenciation nette des espèces étudiées.

Fonctions d'assimilation. — La fonction la plus importante des microbes est certainement la fonction d'assimilation : c'est donc dans l'étude de cette fonction que l'on peut espérer trouver les signes différentiels les plus tranchées.

A ce point de vue, on peut la considérer sous trois aspects différents :

1° La recherche des substances chimiques pouvant servir d'aliment à l'espèce étudiée ;

2° L'observation des moyens employés par le microbe pour l'utilisation de ces aliments ;

3° La détermination des modifications chimiques du milieu produites par le développement microbien.

Les deux grandes classes d'aliments, azotés et hydrocarbonés, sont justifiables de cette méthode.

Alimentation azotée. — En procédant du simple au composé, on peut constater que les microbes étudiés ont besoin, comme source d'azote, d'aliments à molécules relativement complexe, Les nitrates, les sels ammoniacaux (azotate, lactate, tartrate, phosphate, malate), l'urée, l'asparagine, soit en simple solution dans l'eau, soit mélangés à du glucose, 2 0/0, et à un phosphate neutre alcalin, ne peuvent être utilisés directement ; sur les milieux ainsi préparés on n'obtient aucun développement.

Les substances extractives azotées du bouillon fournissent aux microbes étudiés un très bon aliment; ceux-ci se développent tous abondamment sur le bouillon de viande de bœuf ou de cheval, moins bien sur celui de veau, de lapin ou de cobaye, faiblement sur le bouillon de poisson (congre, hareng). Mais la présence, sauf chez ce dernier, d'hydrates de carbone dans le

milieu, la difficulté de la détermination des substances extractives utilisées, les résultats variables obtenus suivant le plus ou moins de temps écoulé depuis la préparation des bouillons, enlèvent à ce milieu toute valeur précise au point de vue de la définition des microbes étudiés.

Parmi les matières albuminoïdes, la peptone donne des résultats très variables. Plusieurs marques de peptone (Cornélis, Chassaing) en solution à 2 et 5 0/0, n'ont donné lieu à aucun développement. Je n'ai obtenu des cultures que sur une solution à 5 0/0 de peptone Chapoteaut, et sur le bouillon de panse préparé suivant la formule de Martin. Il est difficile, dans ces conditions, d'affirmer que la peptone est un bon aliment pour les espèces étudiées, les peptones commerciales étant des substances relativement impures et complexes, et le bouillon Martin contenant les substances extractives de la viande, ainsi qu'une certaine quantité d'hydrates de carbone. La gélatine seule n'est pas utilisée par les bacilles étudiés, les milieux simplement gélatinisés restent stériles. Mais s'ils contiennent d'autres substances capables de pourvoir aux frais de premier établissement des microbes, la gélatine est liquéfiée et partiellement transformée en glycocolle.

La caséine dissoute dans une solution faible de phosphate alcalin, la fibrine du sang, la syntonine préparée par l'action de l'acide chlorhydrique sur la chair musculaire déjà macérée, l'albumine coagulée de l'œuf, sont des substances très favorables au développement de toutes les espèces étudiées ; elles les digèrent rapidement et donnent sur les milieux ainsi préparés de très abondantes cultures. Les sérosités naturelles fraîches et non chauffées ne fournissent pas à ces microorganismes un milieu favorable. Les cultures sur sérum, sérosité pleurétique, liquide d'ascite ou d'hydrocèle, sont toujours maigres et fragiles. Les mêmes milieux, longtemps conservés ou coagulés par la chaleur, donnent au contraire des cultures abondantes. Je pense que l'action antitryptique du sérum et des sérosités, sur laquelle nous aurons à revenir, n'est pas étrangère à la production au moins partielle de ce phénomène.

L'hémoglobine en solution à 5 0/0, coagulée par la chaleur, peut également fournir un milieu favorable ; mais stérilisée par filtration, elle reste toujours stérile.

Cette faculté de digestion des substances albuminoïdes solides, commune à tous les bacilles étudiés, est assez importante pour constituer un des meilleurs caractères du groupe, et même dans certain cas un procédé assez commode d'isolement. Sur un milieu composé uniquement d'eau tenant en suspension des cubes d'albumine d'œuf cuit, ou des flocons de fibrine soigneusement lavée, le nombre des microbes pouvant donner lieu à un développement anaérobie est très restreint. Sur ces milieux privés à peu près complètement de substances hydrocarbonées, *toutes* les espèces étudiées sporulent facilement et abondamment. Par le chauffage, on peut ensuite facilement obtenir des cultures ne contenant que des microbes de ce groupe.

Sécrétion de trypsine. — Cette digestion des substances albuminoïdes est, ainsi que l'on devait s'y attendre, liée à la sécrétion d'une véritable trypsine. Néanmoins, la mise en évidence de cette action tryptique n'est pas aussi facile que l'on pouvait l'espérer. Par la filtration sur bougie de cultures douées d'un pouvoir digestif considérable, on n'obtient en effet qu'un liquide complètement inactif. Si l'on prend soin d'opérer dans un courant de gaz d'éclairage ou d'hydrogène, le filtrat possède quelques propriétés digestives; mais, pour mettre en évidence une action tryptique de quelque intensité, tout en se mettant en garde contre l'action directe des microbes, il est nécessaire de recourir à un procédé plus complexe. Après avoir soigneusement centrifugé, j'ai pu constater que la diastase est libre dans le liquide et nullement fixée, comme on aurait pu le craindre, à la surface de la spore. Le liquide clair possède en effet les mêmes propriétés digestives que le dépôt.

La centrifugation ne débarrassant pas le liquide de tout germe, j'ai cherché à supprimer physiologiquement l'action vitale des bacilles restés en suspension, en les plaçant dans des conditions absolument défavorables à leur développement, alors que l'action diastasique n'en subit aucune atteinte.

En opérant à 48° et en présence de quelques gouttes de chloroforme ou, mieux, d'essence de moutarde, il m'a été possible d'étudier l'action tryptique produite par les microbes de ce groupe. Dans ces conditions, en effet, il est facile de mettre en évidence la peptonisation de la substance albuminoïde qui

constitue le stade digestif le plus long et le plus important, l'apparition de la leucine et de la tyrosine étant considérablement retardée. Sur les cultures vivantes, au contraire, le stade de peptonisation est immédiatement suivi de l'utilisation de la peptone par le bacille et de sa décomposition en produits plus simples, ce qui fait qu'à aucun moment on ne trouve, dans les milieux de culture, de la peptone en quantité notable.

Cette diastase agit puissamment sur la gélatine qu'elle liquéfie, la caséine, la fibrine, la syntonine, l'albumine de l'œuf qu'elle peptonise. Elle se rapproche de la trypsine du pancréas par l'influence qu'exerce sur elle la réaction du milieu. Son action, nulle en un milieu acide au méthyl-orange, faible dans un milieu neutre au méthyl-orange mais encore acide au tournesol, n'est vraiment efficace qu'à partir de la neutralité au tournesol, pour avoir son maximum en présence de l'alcalinité au tournesol, bien avant l'alcalinité à la phtaléine du phénol.

Elle se rapproche encore davantage de la pancréatine par l'action antitryptique qu'exercent sur elle les sérums. Il suffit en effet de quelques gouttes de sérum d'animal adulte (homme, chèvre, lapin, cobaye) pour empêcher l'action de la trypsine contenue dans 3 ou 4 c. c. de liquide de culture centrifugés. L'action du sérum semble être parallèle à celle qu'il exerce sur la trypsine pancréatique. Le sérum des animaux vaccinés contre la pancréatine, au point d'avoir un pouvoir antitryptique dix fois plus fort que celui du sérum normal, se trouve également plus efficace, bien que dans une proportion un peu moindre, vis-à-vis de la trypsine des bactéries étudiées.

Cela semble donner l'explication d'un fait que j'avais observé depuis longtemps. Si l'on conserve dans des pipettes la sérosité pathologique produite par l'inoculation du vibrion septique, du bacille du rhumatisme, etc., on obtient, surtout en ce qui concerne ce dernier dont la virulence est très variable, on obtient, dis-je, des résultats très différents suivant l'âge et le sexe de l'animal — le cobaye dans l'espèce. — Si l'on a opéré sur une femelle pleine ou sur un cobaye très jeune, le sérum, après quelques jours de séjour à l'étuve, est complètement digéré, répand une odeur aromatique et sulfurée spéciale, et contient des spores en grande abondance. Si l'animal était au contraire âgé, on n'observe ni digestion ni sporulation, sans

néanmoins que la réaction du milieu soit devenue acide.

Or, si l'on mesure le pouvoir antitryptique du sérum de cobaye soit vis-à-vis de la pancréatine, soit vis-à-vis des trypsines bactériennes, on constate que celui du sérum de l'animal adulte est beaucoup plus considérable que celui des animaux jeunes, qu'il est nul à la naissance, plus marqué chez les mâles que chez les femelles, et qu'il subit pendant la grossesse un affaiblissement très marqué. Il y aurait peut-être lieu de rapprocher ce fait de la prédisposition incontestable des cobayes jeunes et des femelles pleines aux formes graves des infections par les bactéries précitées.

Quant à l'époque de la sécrétion de la trypsine par les microbes, on peut constater que pendant les 36 à 48 premières heures de la culture, on ne trouve presque pas de diastase libre dans le liquide de culture. Celle-ci ne commence à apparaître que lorsque, la sporulation se produisant, le corps microbien commence à se résorber. Elle atteint son maximum lorsque, presque tous les corps bacillaires ayant disparu, on ne trouve plus que des spores libres. Plus tard, l'alcalinité du milieu augmentant, le pouvoir tryptique diminue pour devenir nul après neutralisation, au bout d'un mois à cinq semaines. L'excrétion de trypsine semble donc être fonction de la sporulation et de la résorption du corps microbien. Lorsque, par la suite de la fermentation d'un hydrate de carbone, la liqueur s'acidifie et que le bacille ne sporule pas, le liquide, après neutralisation, ne possède aucune propriété tryptique.

En somme, la digestion des substances albuminoïdes, par les bacilles de ce groupe, est absolument analogue, au moins dans ses premières phases, à la digestion pancréatique, et diffère notablement des digestions dues à l'action de la pepsine, de la papaïne, de l'actinodiastase, et de la diastase protéolytique de l'aspergillus.

Produits formés. — A part la gélatine qui se transforme partiellement en glycocolle sous l'influence des microbes étudiés, la fibrine, l'albumine, la peptone, la caséine, donnent comme produits ultimes des substances analogues, quel que soit le microbe de ce groupe. Le processus est un processus de putréfaction rapide et produit une simplification progressive de la molécule albuminoïde en l'attaquant par son côté uréique.

L'odorat, réactif très sensible en l'espèce, ne peut déceler aucune différence entre les différents microbes du groupe; mais l'odeur spéciale, difficile à définir, que dégagent les cultures, est, à mon avis, un des meilleurs caractères de ce dernier.

L'analyse chimique décèle la présence d'hydrogène sulfuré, d'acide carbonique, d'ammoniaque, d'ammoniaques composées (triméthylamine), de peptone en quantité souvent très faible, de leucine, de tyrosine et d'acides gras. Parmi ces derniers se rencontre un peu d'acide butyrique et d'acide valérianique que l'on peut caractériser par la distillation fractionnée. L'eau bromée ne décèle pas la présence de phénol libre. Ce dernier, en effet, s'unit aux acides gras pour former des corps complexes, parmi lesquels se trouve toujours, en certaine abondance, l'acide paroxyphénylpropionique.

Il est intéressant, en outre, de signaler que sur fibrine, sur albumine, mais surtout dans les solutions concentrées de peptone, tous les bacilles du groupe donnent lieu à la formation, en quantité variable et jamais très abondante, d'un pigment noir insoluble dans l'eau, l'alcool, les alcalis concentrés, soluble dans l'acide sulfurique et qui présente de grandes analogies avec la mélanine.

Alimentation hydrocarbonée. — A l'inverse des aliments azotés, les substances ternaires sont impuissantes, à elles seules, à assurer le développement des bactéries étudiées. Il est donc indispensable de bien fixer les conditions expérimentales de ces recherches et en premier lieu la nature de l'aliment quaternaire qui doit constituer la source d'azote. A ce prix seulement les résultats seront comparables, car, ayant le choix entre ses aliments, le microbe commence toujours par consommer celui dont l'assimilation lui est le plus facile. Il est donc nécessaire, pour pouvoir étudier les différences dans l'action des bactéries sur les hydrates de carbone, que l'alimentation azotée constitue un élément fixe et bien défini.

Cette considération suffit pour éliminer les bouillons de viande usuels. Ils contiennent, en effet, des hydrates de carbone (glycose, inosite, glycogène), et les méthodes préconisées pour les en priver n'atteignent qu'incomplètement leur but. En outre, leur composition varie dans de trop grandes proportions suivant l'âge de l'animal, le muscle choisi, l'état de

fraîcheur plus ou moins grande de la viande, le temps écoulé depuis la préparation, etc. Le bouillon de poisson, bien que ne présentant pas la plupart de ces inconvénients, n'est pas un milieu assez nutritif pour obtenir la préférence.

La peptone, nous l'avons vu plus haut, donne des résultats très variable, et le milieu préconisé par M. Grimbert pour ces recherches reste le plus souvent stérile.

Les milieux à l'hémoglobine, la syntonine, la fibrine, l'albumine de l'œuf, sont mieux définis. Voici la méthode qui m'a paru donner les résultats les plus comparables tout en permettant, sans ouvrir le tube et sans faire d'analyse chimique, de constater si l'hydrate de carbone étudié a subi ou non la fermentation acide.

Le blanc d'œuf de poule, frais et cuit dur, soigneusement séparé du jaune, est coupé en petits cubes qui sont placés dans un tube à essai avec quatre ou cinq fois leur volume d'eau, soit environ 2 grammes de blanc d'œuf pour 10 c. c. d'eau de rivière. Le tout est ensuite stérilisé pendant un quart d'heure à 120°.

Ce milieu, très facile à préparer, donne lieu à des cultures abondantes et présente de grands avantages si l'on veut étudier l'action des bacilles sur les hydrates de carbone. Il suffit, en effet, de dissoudre à la dose de 3 0/0 la substance à étudier dans l'eau où sont plongés les cubes d'albumine. Si l'hydrate de carbone n'est pas attaqué, l'albumine se dissout sous l'influence de la trypsine sécrétée par les microbes. On peut alors affirmer la présence de spores dans les cultures. Si, au contraire, l'hydrate de carbone subit la fermentation acide, l'albumine reste intacte, l'action de la trypsine ne pouvant s'exercer en milieu acide.

On peut de cette manière apprécier, sans ouvrir le tube de culture, la réaction qui s'est produite, par suite de *la constance des rapports entre les facteurs suivants :* d'une part, *fermentation de l'hydrate de carbone, acidité, albumine intacte, absence de sporulation;* d'autre part, *hydrate de carbone non fermenté, alcalinité, dissolution des cubes d'albumine, sporulation.*

Néanmoins, pour que les résultats soient absolu ment comparables, la constance du milieu n'est pas suffisante; il faut encore déterminer étroitement les conditions de l'ensemencement. Si, en effet, on se sert d'une culture sporulée, contenant,

par résorption du corps microbien, de la trypsine à l'état libre, cette dernière peut agir sur l'albumine avant que la fermentation de l'hydrate de carbone ait produit une acidité suffisante pour en empêcher l'action, et alors la culture s'oriente d'une manière toute différente. On peut éviter cet obstacle de deux manières :

1° En ensemençant avec une culture datant de moins de 36 heures;

2° En chauffant pendant 10 minutes, à 90°, la culture sporulée avant de pratiquer l'ensemencement qui doit toujours être très discret.

Dans ces conditions bien déterminées, la méthode donne des résultats fort comparables auxquels il ne faut pourtant pas demander une rigueur trop absolue. En effet, il semble bien que, dans certains cas, les microbes utilisent en très faible proportion l'hydrate de carbone ajouté, sans que cette fermentation s'oppose à la digestion de l'albumine. Cette utilisation se traduit surtout par un développement plus abondant. Mais il est permis de se demander s'il ne s'agit pas principalement dans cette action d'une modification osmotique du milieu qui le rend plus favorable à la culture.

Ces restrictions faites sur la valeur chimique absolue du procédé, il est incontestable que, dans l'application, il donne des résultats très constants et par cela même très utiles comme élément de différenciation entre les espèces.

Produits de fermentation. Sauf quelques insignifiantes différences de proportion, les produits de fermentation se sont montrés les mêmes, quelques soient l'hydrate de carbone et le microbe étudiés.

Dans aucun cas, le compte-goutte de Duclaux et l'alcoomètre n'ont permis de déceler la présence d'un alcool dans la liqueur distillée après neutralisation; pendant la distillation, on n'observe à aucun moment le phénomène des stries. Dans le liquide distillé se trouvent néanmoins quelques corps, de nature probablement aldéhydique, générateurs d'iodoforme et donnant, mais peu franchement, la réaction de Legal. Les bacilles étudiés se différencient donc nettement du *Bacillus orthobutylicus* de Grimbert et des autres microbes analogues.

Après addition d'acide oxalique, la distillation met en évidence

une proportion notable d'acides volatils dont on peut facilement augmenter la quantité en ajoutant de la craie au milieu de culture. Le dosage en devient alors plus facile. La méthode de distillation fractionnée de M. Duclaux montre que l'on n'a pas affaire à un seul acide mais bien à un mélange. Les chiffres obtenus, dans un grand nombre de distillations ne varient que de quelques dixièmes, ce qui indique que le mélange d'acide se fait à peu près constamment dans la même proportion.

Voici la moyenne de plusieurs dosages.

Nombre de centimètres cubes.	Proportion 0/0 d'acide passé à la distillation.	Théorie pour un mélange de : 1 partie d'acide butyrique. 1 partie d'acide acétique.	2 parties d'acide butyrique. 1 partie d'acide acétique.	1 partie d'acide butyrique. 8 parties d'acide propionique.
10	13,47			
20	26,02			25
30	38,04	35,2	32,5	36,7
40	49,34	46,0	50,8	47,7
50	59,56	55,7	60,7	58,3
60	68,69	65	69,8	68,1
70	77,39	73,7	78	77,3
80	85,21	82,2	85,6	
90	92,17			
100	100			

On aurait pu hésiter entre un mélange d'acide acétique et butyrique, ou d'acide butyrique et propionique; mais quelques dosages ont donné des chiffres inférieurs, dans les premières portions distillées, au chiffre théorique de l'acide propionique pur. Il s'agit donc bien d'un mélange d'acide acétique et butyrique dans la proportion moyenne de 5 parties d'acide acétique pour 3 parties d'acide butyrique.

L'acidité fixe est toujours peu considérable et semble due à de faibles quantités d'acides lactique et succinique.

Mais si les produits fournis sont les mêmes, le pouvoir acidifiant varie suivant le bacille observé, et la réaction s'arrête plus ou moins tôt suivant la sensibilité du microbe, aux acides formés. Voici, en effet, la quantité d'eau de chaux nécessaire pour neutraliser un centimètre cube de culture arrêtée dans son développement par l'acidité consécutive à la fermentation du maltose. Ces chiffres sont, j'ai pu le vérifier plusieurs fois, à peu près constants lorsque la culture est livrée à elle-même.

Bacille putrificus.	Bacille Legros.	Vibrion septique.	Bacille botulisme.	Bacille ch. symptomatique.	Bacille Achalme.	Bacille Klein.	*Bacille perfringens*
0,60	0,65	0,68	0,74	0,88	0,94	0,95	0,97

Fermentation des hydrates de carbone en particulier.

Maltose. — Le maltose est le sucre qui fermente le plus facilement sous l'influence des microbes étudiés. Seul, le bacille tétanique dissout l'albumine en sa présence, et encore, pour obtenir ce résultat, est-il nécessaire de prendre quelques précautions. Le milieu blanc d'œuf coagulé est, en effet, légèrement alcalin. Si l'on porte trop longtemps à une trop haute température ce milieu contenant 3 0/0 de maltose, il se produit une légère caramélisation du sucre, ayant pour résultat de teinter le liquide et les cubes d'albumine en un jaune brun plus ou moins accentué. Lorsque le milieu a été ainsi modifié, l'albumine devient d'une digestion plus difficile, et il en résulte, par comparaison, une fermentation plus facile du sucre qui, dans ces conditions, fermente sous l'action du bacille tétanique. Pour éviter cette caramélisation, il est nécessaire de neutraliser exactement le liquide avant la stérilisation et de se contenter pour cette dernière d'une exposition pendant 10 minutes à la température de 110°-115°.

Glycose. — La même observation s'applique à la préparation des milieux glycosés. Le glycose fermente un peu plus difficilement que le maltose. Le bacille tétanique, le vibron septique, le bacille du charbon symptomatique, sont sans action sur lui, lorsque le milieu a été préparé avec soin, mais ils l'acidifient en cas de caramélisation légère.

Galactose. — Ce sucre est un peu moins fermentescible encore que le glycose. L'albumine se dissout dans les cultures de bacille tétanique, de bacille du charbon symptomatique, de bacille du botulisme et de vibrion septique.

Lactose. — Ici a lieu la scission absolue entre les deux sous-groupes que forment les bacilles étudiés. D'une part, le bacille tétanique, le vibrion septique, le bacille du charbon symptomatique, le bacille du botulisme, le bacille décrit par Legros, le *Bacillus putrificus coli* ne font jamais, dans les conditions définies, fermenter ni la lactose ni aucun des sucres suivants. D'autre part, le bacille que j'ai décrit, celui de Klein, le *Bacillus perfringens* exercent au contraire sur un certain nombre d'entre eux une action fermentative vigoureuse.

Saccharose. — Sous l'influence de ces dernières bactéries, le saccharose fermente directement et sans qu'il soit possible

à aucun moment de déceler soit un ferment inversif, soit une trace de sucre interverti.

Inosite. — La structure moléculaire, probablement cyclique, de ce sucre, et sa présence constante dans l'organisme animal, rend particulièrement intéressante l'étude de sa fermentation. Or, il se comporte comme les deux sucres précédents, fermentant sous l'influence des mêmes bacilles et ne présentant aucune particularité quant aux produits formés.

Glycérine. — La glycérine est également attaquée par le *Bacillus perfringens*, les bacilles d'Achalme et de Klein ; les autres espèces ne lui font subir aucune modification ; sa présence, à l'inverse de celles des substances précédentes, semble plutôt les gêner dans leur développement.

Dextrine. — La présence de dextrine favorise au contraire la culture de toutes les espèces étudiées ; mais les trois mêmes bacilles sont seuls à provoquer une fermentation acide suffisante pour paralyser l'action tryptique. Cette fermentation est consécutive à l'action d'une amylase transformant la dextrine en maltose. On peut isoler l'action de cette diastase d'une manière analogue à celle signalée plus haut pour la trypsine.

Amidon. — L'amidon se comporte comme la dextrine. Une particularité assez constante pour être utile, doit en plus être signalée. Le bacille du charbon symptomatique possède la propriété de liquéfier l'empois d'amidon à 3 0/0, mais sans pouvoir en pousser plus loin la transformation. Le bacille tétanique, le vibrion septique, le bacille du botulisme, le *bacillus putrificus*, le bacille de Legros ne présentent pas cette particularité.

Mannite-Dulcite. — Dans les milieux à la mannite et à la dulcite, la digestion de l'albumine se fait rapidement, quelle que soit l'espèce en expérience. Néanmoins la culture est plus abondante que dans les milieux ne contenant que l'albumine et l'eau. Le *Bacillus orthobutylicus* de Grimbert fait fermenter au contraire activement ces deux substances.

Inuline. — L'inuline reste également intacte sauf en présence du *Bacillus orthobutylicus*. L'amylase sécrétée par les bacilles agissant sur l'amidon, reste sans effet sur l'inuline conformément à l'observation de Grimbert.

Erythrite. — Cette substance ne donne lieu à aucune fermen-

tation et sa présence semble plutôt nuire au développement des cultures.

Amygdaline. — La fermentation de ce glycoside est intéressante, en ce qu'elle permet de séparer nettement le *Bacillus putrificus coli* des autres espèces étudiées. Alors qu'en présence de l'amygdaline l'albumine est rapidement digérée par ces dernières, elle reste intacte dans les tubes ensemencés avec le *Bacillus putrificus.* Lorsqu'on ouvre le tube, on constate une forte odeur d'amandes amères; l'acidité n'est jamais très considérable et la fermentation du glycose, résultant de la décomposition de l'amygdaline, semble surtout gênée par les autres produits formés. Par le procédé signalé plus haut à propos de la trypsine, on peut facilement mettre en évidence la présence d'une émulsine. Le *Bacillus orthobutylicus* partage avec le *Bacillus putrificus* cette propriété.

L'aspect de l'albumine en présence des différentes substances hydrocarbonées, ainsi que l'influence de ces dernières sur l'abondance de la culture, peut donc offrir un intérêt marqué dans la différenciation des bacilles étudiés, ainsi que l'indique le tableau de la page suivante.

En dehors de leur action pathogène, on peut donc caractériser de la manière suivante les bacilles qui font l'objet de cette étude.

Caractères communs du genre.

Bacilles anaérobies, se colorant par la méthode de Gram et mieux par celle de Claudius, produisant des spores, mais seulement en milieu alcalin, liquéfiant la gélatine, dissolvant à l'aide d'une trypsine, l'albumine, la fibrine, la caséine : donnant naissance par la fermentation des hydrates de carbone à la formation d'acides volatils consistant en un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique.

Si l'on veut caractériser par un mot la fonction chimique de ce groupe, on pourrait leur donner le nom de groupe des *bacilles anaérobies trypto-butyriques.*

Pour différencier chaque *espèce*, il est possible de tirer du tableau la table dichotomique suivante :

	Maltose.	Glycose.	Galactose.	Lactose.	Saccharose.	Inosite.	Glycérine.	Dextrine.	Amidon.	Mannite.	Dulcite.	Inuline.	Érythrite.	Amygdaline.
Bacille du tétanos..	dissoute + +	dissoute + +	dissoute + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute +	dissoute + + +	amidon intact dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute —	dissoute + + +
Vibrion septique....	intacte + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute —	dissoute + + +	amidon intact dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute —	dissoute + + +
Bacille du charbon symptomatique ...	intacte +	dissoute + + +	dissoute +	dissoute +	dissoute + +	dissoute + + +	dissoute —	dissoute + + +	amidon liquéfié dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + +	dissoute — —	dissoute + + +
Bacille du botulisme.	intacte + + +	intacte + + +	dissoute + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute +	dissoute + + +	amidon intact dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute —	dissoute + + +
Bacille de Legros...	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute — —	dissoute + + +	amidon intact dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute —	dissoute + + +
Bacillus putrifieus.	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute — —	dissoute + + +	amidon intact dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute +	odeur amandes amères intacte + + +
Bacille d'Achalme..	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	amidon saccharifié intacte + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute —	dissoute + + +
Bacille de Klein....	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	amidon saccharifié intacte + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute +	dissoute + + +
Bacillus perfringens.	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	intacte + + +	amidon saccharifié intacte + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute + + +	dissoute +	dissoute + + +

Le signe + indique une augmentation dans l'abondance des cultures.

Le signe — indique une diminution.

1. Culture en présence d'amidon 3 0/0.
— amidon intact. Albumine dissoute, 2.
— — liquéfié. Albumine dissoute. B. du charbon symptomatique.
— — saccharifié et fermenté. Bacille d'Achalme.
— — — Bacille de Klein.
— — — *Bacillus perfringens.*
2. Culture sur amygdaline. Albumine intacte. *Bacillus putrificus coli.*
— — Albumine dissoute, 3.
3. Culture sur glycose...... Albumine intacte, 4.
— — Albumine dissoute, 5.
4. Culture sur galactose... Albumine intacte. Bacille de Legros.
— — Albumine dissoute. Bacille du botulisme.
5. Culture sur maltose..... Albumine intacte. Vibrion septique.
— — Albumine dissoute. Bacille tétanique.

De la lecture du tableau précédent et de cet essai de différenciation, il est facile de se convaincre que, si certaines distinctions sont fragiles, par exemple celle entre le bacille du charbon symptomatique et le vibrion septique, il est possible d'isoler des autres espèces un sous-groupe bien caractérisé formé par le bacille d'Achalme, celui de Klein, et le *Bacillus perfringens.*

Mais, il est impossible de pousser plus loin la différenciation entre ces trois bacilles, et ma conviction est qu'ils ne forment qu'une seule et même espèce, à laquelle il faut probablement ajouter le bacille du phlegmon gazeux de Fraenkel et certains microbes que l'on rencontre parfois, bien que fort tardivement, à l'état normal, dans la flore cadavérique.

En ce qui concerne en effet les trois bacilles précités, leurs propriétés pathogènes sont expérimentalement les mêmes. Les lésions qu'ils provoquent chez les cobayes, les lapins, etc., ne présentent aucune différence sensible. Leur virulence est soumise aux mêmes amples variations. Chez l'homme même l'action semble analogue. En effet, l'absorption involontaire de spores du bacille que j'ai décrit a provoqué chez moi des phénomènes intestinaux pouvant justifier le nom de *Bacillus enteritidis*, et rappelant en même temps les accidents connus sous le nom de coliques d'amphithéâtre.

Au fond, les différences signalées par les auteurs ne sont autre chose que des différences d'origine, et s'il a été décrit plusieurs espèces différentes, c'est que sa description biologique ne s'est complétée que peu à peu.

En résumé, il s'agit là, comme je l'ai déjà indiqué au congrès de 1900, d'un bacille à tout faire que l'on ne peut mieux comparer qu'au streptocoque dans son action pathogène. La maladie spécifique qu'il provoque par son développement

dans le myocarde est le rhumatisme articulaire aigu, de même que le streptocoque produit la maladie spécifique, l'érysipèle; mais il est susceptible, comme ce dernier, de provoquer, soit seul, soit associé, des maladies à lésion banale, tels qu'abcès, gangrènes, entérites, infections puerpérales, etc., etc.

Il est donc nécessaire de donner, pour la clarté des faits, un état civil unique à ce bacille que j'ai décrit, pour la première fois en 1891, comme agent pathogène du rhumatisme articulaire aigu, puis dont la description a été donnée en 1892 par Welch et Nuttal dans la flore cadavérique, par Fraenkel en 1893 comme agent pathogène du phlegmon gazeux, par Klein en 1895 sous le nom de *Bacillus enteritidis sporogenes*, enfin en 1898 par Veillon et Zuber sous la dénomination de *Bacillus perfringens*.

Voici, du reste, pour servir à son histoire, la liste des principaux travaux auxquels ces divers avatars ont donné lieu.

BACILLE DU RHUMATISME ARTICULAIRE AIGU

ACHALME, *Société de biologie*, séance du 25 juillet 1891, Examen bactériologique d'un cas de rhumatisme articulaire aigu terminé par la mort.

ACHALME, *Société de biologie*, séance du 13 mars 1897. Pathogénie du rhumatisme. Examen bactériologique d'un cas terminé par la mort, p. 276.

THIROLOIX, *Société de biologie*, 1897, séance du 13 mai, p. 268; séance du 9 octobre, p. 882; séance du 6 novembre, p. 945. *Société médicale des hôpitaux*, séance du 5 novembre 1897.

ACHALME, Recherches bactériologiques sur le rhumatisme articulaire aigu. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897, novembre, p. 845.

TRIBOULET ET COYON, *Société médicale des hôpitaux*, séance du 24 décembre 1897; *Le Rhumatisme articulaire aigu*, Baillère, in-16, 95 pages.

SAVTCHENKO, Sur le rhumatisme articulaire et la bactérie d'Achalme, *Archives russes de pathologie*, mai 1898, avec planche en couleurs, p. 558; extrait en français par l'auteur, p. 613.

CARRIÈRE, *Société de biologie*, 1898, p. 736. Rhumatisme articulaire aigu. épanchement pleurétique, présence du bacille d'Achalme.

PIC et LESIEUR, Contribution à la bactériologie du rhumatisme articulaire aigu, *Journal de physiologie et de pathologie générale*, 1898, p. 1007.

DE BETTENCOURT, Note sur la présence du bacille d'Achalme dans le sang d'un homme atteint de rhumatisme articulaire aigu, *Archivos de Medicina*, t. II, n° 2.

HEWLETT, Présence du bacille d'Achalme dans un cas de rhumatisme articulaire aigu; son identité probable avec le *Bacillus enteritidis sporogenes* (Klein), *Pathological Society of London* in *The Lancet*, 1901, p. 705.

BACILLUS EMPHYSEMATOSUS DE FRANKEL

FRAENKEL, *Centralblatt für Bakteriologie*, Bd. XIII, p. 13, et *Ueber Gasphlegmonen*, Hamburg et Leipzig (L. Voss).

CHAVIGNY, Gangrène gazeuse subaiguë provoquée par un bacille spécial, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897, n° 11, p. 860.

FRAENKEL, Sur la cause du phlegmon gazeux, *Munchener Med. Wochenschrift*, 1899, n° 42, p. 1369.

HIBLER, Recherches sur la connaissance des bactéries anaérobies étudiés dans les maladies de l'homme et des animaux, *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1899, vol. XXV, p. 513.

HITSCHAMANN ET LINDELTHAL, Recherches sur la gangrène foudroyante, *Arch. f. Klin, chirurgie*, Bd. LIX, 1899, 1re partie, et XXVIII, congrès allemand de chirurgie, Berlin, 5-8 avril 1899.

BACILLUS PERFRINGENS (VEILLON)

VEILLON ET ZUBER, Recherches sur quelques microbes anaérobies et sur leur rôle en pathologie, *Archives de médecine expérimentale*, juillet 1898.

RIST, *Étude bactériologique sur les infections d'origine otique*, Th. Paris 1898.

GUILLEMOT, *Recherches sur la gangrène pulmonaire*, Th. Paris 1898.

— Sur un cas de gangrène gazeuse due à un bacille anaérobie différent du vibrion septique, *Soc. biologie*, 5 nov. 1898.

BACILLUS ENTERITIDIS SPOROGENES

KLEIN, Rapport sur les relations entre le choléra asiatique et le choléra nostras, *Report of the med. offices, local governement board*, 1895, p. 197; 1896, p. 225.

KLEIN, Morphologie et biologie du *bacillus enteritidis sporogenes*, son rôle dans les diarrhées infantiles et le choléra nostras et sa présence dans le lait, le fumier, etc. *Report of the medical officer, local governement board*, 1897-98, p. 210; *Auxiliary scientific association*, 1898.

OSKAR WILD, Travail sur la connaissance du *Bacillus enteritidis sporogenes*. *Centr. f. Bakteriologie*, 1898, vol. XXIII, p. 913.

HIBLER, V. plus haut.

HEWLET, Observations préliminaires sur la présence du *Bacillus enteritidis sporogenes* (Klein) dans la colite ulcérative et les selles normales, *Transactions of the Jenner Institut of preventive medicin*, vol. II, p, 70.

BACILLUS CADAVERIS BUTYRICUS

WELCH ET NUTTAL, Bacille produisant des gaz et capable d'un rapide développement dans le cadavre après la mort. *The Johnson Hopkins Hopital*, Bulletin 1892, n° 24.

ERNST, Sur un bacille producteur de gaz et sa présence dans le cadavre humain, *Virchows Archiv.*, t. CXXXIII.

STERNBERG, Cité in *Traité de Flugge*, t. XXI.

GOBEL, Sur le bacille des organes emphysémateux (Schaumorganen) *Centr. f. Pathol. Anatomie*, Bd. VI.

HEYDENREICH, Emphysème du foie. *Centr. f. Bakteriol.*, t. XXI.

BUDAY, Sur la production anormale de gaz après la mort. *Centralbl.f, Bakter.* 1898, t. XXIV, p. 369.

LE ROUGE NEUTRE (NEUTRALROTH)

Son rôle dans l'étude de la phagocytose en général et dans celle de la blennorrhagie en particulier.

Par le Dr I. HIMMEL (de Kazan).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Le rouge neutre (*neutralroth*) est un chlorhydrate de diméthyldiamidotoluphénacétine.

Ehrlich[1] a le premier signalé la propriété que possède cette matière colorante de teindre les éléments cellulaires vivants. D'après cet auteur, cette propriété est surtout due à ce fait que le rouge neutre (*neutralroth*) diffuse facilement à travers les éléments cellulaires vivants, éléments contenant des subtances qui fixent énergiquement cette matière colorante.

Le rouge neutre a été ensuite étudié par plusieurs auteurs, et notamment par M. Plato, qui a consacré plusieurs mémoires à ce sujet; voici comment il résume les résultats de ses expériences.

Les substances qui se colorent à l'intérieur des leucocytes sont des matières albuminoïdes englobées telles que : microorganismes, hématies, spermatozoïdes, produits de désagrégation d'autres cellules, etc.

La coloration de la majeure partie de ces inclusions dépend de la vitalité de la cellule englobante; l'auteur désigne cette coloration sous le nom *d'intravitale.*

La coloration se conserve seulement dans le granuloplasme et disparaît dans l'hyaloplasme. La coloration intravitale dépend de la position des inclusions colorées qui perdent leur couleur en quittant la cellule.

La partie vitale colorable des vacuoles, ainsi que celle des

1. Ehrlich, Ueber Neutralroth, *Allg. Medic. Centralzeitung*, 1894, n° 2.

produits des échanges nutritifs et de sécrétion intraleucocytaire, ne doivent pas être prises pour la partie constituante de la cellule en état de fonctionnement.

La coloration intravitale des microorganismes intracellulaires dépend aussi bien de l'état vital de la cellule que de l'influence qu'exercent ces microorganismes sur la cellule englobante. Le granuloplasme produit sur le rouge neutre un effet oxydant, l'hyaloplasme exerce sur lui une action réductrice.

Dans mes recherches personnelles j'ai commencé par étudier les changements de coloration subis par le rouge neutre, quand ses solutions sont additionnées d'acides et d'alcalis. Étant donné que j'ai, pendant tout le cours de mon travail, expérimenté, comme Plato, avec des solutions faibles, j'ai préparé la même solution que cet auteur, c'est-à-dire que je mélangeais 1 c. c. de la solution saturée à froid de neutralroth avec 100 c. c. d'une solution à 0,6 p. 100 de chlorure de sodium.

Déjà Ehrlich avait indiqué que des traces d'alcali et même l'eau de puits, ainsi que l'acide carbonique de l'air, influent considérablement sur le changement de couleur de la solution de rouge neutre.

Je prenais 100 c. c. d'une solution à 1/4 p. 100 d'un alcali ou d'un acide quelconque, et j'y ajoutais 5 gouttes de la solution de neutralroth, préparée comme je viens de le dire; dans tout le cours de mon exposé, je parlerai seulement de cette solution, et je ne mentionnerai spécialement que les solutions d'une autre concentration. En même temps, j'ajoutais, à 100 c. c. d'eau distillée, 5 gouttes de solution de neutralroth. Tandis que ce dernier mélange restait à peu près incolore, la solution acide se colorait en rouge intense. La nuance prise par le mélange de rouge neutre avec les acides chlorhydrique, sulfurique, azotique, lactique, citrique, oxalique, acétique, tartrique était violette, tandis qu'avec des amido-acides, surtout avec la leucine, ce mélange présentait une couleur rouge brique.

L'addition d'une même quantité de neutralroth aux solutions alcalines ne provoquait aucun changement : la solution alcaline restait aussi incolore qu'avant l'addition du rouge neutre. Ces observations m'ont permis d'en tirer cette conclusion qu'on peut obtenir, même avec des solutions faibles de neutralroth, une coloration rouge intense si les substances colorables ont un degré

suffisant d'acidité. Point n'est besoin d'expliquer ce phénomène de coloration intense par l'accumulation plus considérable de matière colorante dans les subtances à colorer. J'ai en effet observé qu'une seule et même quantité de matière colorante peut colorer les liquides en rouge intense ou ne pas les colorer du tout, suivant leur degré d'alcalinité ou d'acidité. J'ai pu m'en convaincre au cours de mes recherches ultérieures en examinant au microscope la cellule de différents fruits. J'écrasais un fragment de fruit quelconque sur la lame porte-objet et, après l'avoir additionné de 1 ou de 2 gouttes d'une solution de rouge neutre, je le couvrais d'une lame couvre-objet et je l'examinais à l'aide d'un objectif sec. Or, j'ai constaté qu'avec la même quantité de couleur la coloration des cellules végétales et du liquide ambiant était plus intense dans les cas où l'acidité du fruit était plus prononcée (ce dont on pouvait se convaincre par l'épreuve au tournesol); dans ceux, au contraire, où la réaction des fruits était neutre ou faiblement acide, on pouvait à peine constater un changement dans l'intensité de la coloration.

J'ai également examiné des substances à réaction manifestement neutre, tels que le talc, le coton réduit en petits fragments et bouilli plusieurs fois dans l'eau distillée, et je les ai colorées au neutralroth. Les fragments de talc ne se coloraient nullement, tandis que les fragments de coton se coloraient légèrement; cette coloration était d'autant plus intense que le flocon d'ouate était plus gros en d'autres termes, la coloration du coton était d'autant plus manifeste que la couche de rouge neutre comprise entre les lames porte et couvre-objet était plus épaisse. Le talc ne fixe pas le rouge neutre, tandis que le coton, composé de fibrilles isolées circonscrivant des espaces libres, permet la pénétration de la matière colorante dans ces espaces et augmente ainsi l'épaisseur de la couche du liquide coloré.

J'ai pu observer le même phénomène pendant la coloration des bactéries mortes et vivantes.

Toute une série de microorganismes tels que le gonocoque, la bactéridie charbonneuse, le bacillus subtilis, le coli-bacille, les bacilles de la grippe, de la diphtérie, du choléra, les bacilles de la tuberculose humaine et aviaire, le streptobacille du chancre mou, la bactérie de Rabinovitch et encore quatre autres

variétés de bacilles pseudo-tuberculeux ne fixent pas du tout la matière colorante tant qu'ils sont vivants, tandis qu'ils se colorent faiblement, il est vrai, dès qu'ils sont morts. La coloration de ces microorganismes morts est d'autant plus intense, que la bactérie est plus grosse; ainsi, la coloration de la bactéridie charbonneuse et du bacillus subtilis était-elle plus prononcée que celle du bacille de la tuberculose ou du chancre mou.

La durée du temps de contact des solutions faibles de rouge neutre est sans aucune influence, et les bactéries laissées dans une goutte pendante, mélangée à du neutralroth, pendant quelques jours, ne présentaient pas de coloration plus intense.

J'ai procédé ensuite à la coloration de différentes cellules de l'organisme animal, telles que les cellules épithéliales à cils vibratils, les cellules endothéliales, les fibres-cellules musculaires du cœur, les cellules hépatiques, les cellules glandulaires de l'estomac, et les cellules nerveuses des cornes antérieures et des ganglions spinaux.

Ces recherches m'ont démontré que les noyaux cellulaires fixent la matière colorante d'une façon plus ou moins intense; dans quelques cas, leur coloration est très faible, et permet seulement de distinguer les contours du noyau colorés en rose; dans d'autres cas, au contraire (dans les cellules nerveuses, par exemple), la coloration des noyaux est si intense, qu'ils prennent une couleur rouge rubis.

Si l'on sèche ces préparations en les chauffant légèrement à la flamme d'un bec de Bunsen, cette coloration ne disparaît pas et se conserve indéfiniment. Dans tous ces cas, le protoplasma cellulaire ne se colore pas du tout pendant toute la durée de l'opération.

Si je voulais chercher à établir une analogie dans la coloration des substances à réaction alcaline et neutre, je pourrais émettre cette hypothèse que la coloration du noyau est due à sa réaction faiblement acide. Mais je préfère m'abstenir d'une telle conclusion avant d'avoir des exemples plus probants.

Pour mes recherches ultérieures, je me suis servi de leucocytes frais, qui ne contenaient aucune substance étrangère dans leur intérieur. Ainsi, je recueillais à l'aide d'une pipette une goutte de liquide péritonéal d'un cobaye absolument sain, auquel

on n'avait pas fait d'injection dans le péritoine, et je l'examinais au microscope après coloration au neutralroth. Généralement, presque tous les leucocytes restaient incolores; leurs noyaux ne fixaient pas non plus de matière colorante, de sorte que pour les distinguer, il fallait se servir d'un éclairage modéré.

Dans quelques leucocytes isolés, on pouvait voir des granulations colorées en rouge vif, avec reflet couleur brique et non violet.

En observant une semblable préparation pendant quelques heures au microscope, on pouvait voir que le nombre de granulations colorées devenait de plus en plus considérable et que leur présence pouvait être constatée même dans les cellules qui, au début, n'en contenaient pas.

24 ou 48 heures après le début de l'expérience, ces granulations commençaient à se décolorer, et les cellules devenaient incolores. Pour me procurer un plus grand nombre de leucocytes, je provoquais la leucocytose en injectant dans le péritoine de cobayes 3 à 5 c. c. de solution physiologique de sel marin; je cherchais à éviter aussi la phagocytose des corps albuminoïdes. A l'examen des leucocytes ainsi obtenus et colorés au rouge neutre, on voyait que le nombre de granulations colorées n'était pas supérieur à celui constaté dans le premier cas, et que l'apparition des granulations colorées et leur décoloration progressive s'effectuait de la même manière.

Enfin, pour l'étude de la coloration des granulations intracellulaires, je me servais également des leucocytes obtenus par injection intrapéritonéale de 3 à 5 c. c. de bouillon stérilisé. On voyait dans ce cas que le nombre de granulations colorées était, même au début de l'opération, supérieur à ce qu'il était dans les deux premiers cas, et qu'avec le temps leur nombre augmentait relativement plus vite; cependant, en continuant l'observation, on constatait que leur coloration s'effectuait de la même manière que dans les deux cas précédents.

La question se posait de savoir ce que représentent ces granulations colorables de la cellule vivante? Est-ce le stroma cellulaire? Sont-ce des granulations basophiles ou éosinophiles colorées pendant la vie? La coloration de contrôle faite à ce dernier point de vue n'a donné aucune indication. S'il s'agissait de la charpente cellulaire, toutes les cellules auraient certai-

nement été colorées, et nous n'aurions constaté aucune différence dans les cas où l'on avait injecté une solution physiologique et du bouillon. Mais, ainsi que je l'ai déjà dit, dans les cas où la leucocytose a été provoquée par l'injection de bouillon, le nombre de granulations colorées était plus considérable que dans le cas où la leucocytose a été provoquée par le liquide physiologique.

Diverses opinions ont été émises sur la nature des granulations colorables. Przumycki pense que ces granulations font partie constituante de la cellule vivante; pour Galleoti, au contraire, les seules particules qui se colorent proviennent de substances englobées par les phagocytes ou sont des produits de l'activité sécrétoire de la cellule. Ehrlich considère ces granulations comme résultant des échanges nutritifs et leur reconnaît une grande affinité pour le rouge neutre. Plato soutient la même opinion. Avec Galleoti, Ehrlich et Plato, j'admets que ces granulations résultent de l'activité sécrétoire de la cellule, mais j'ajouterai que leur réaction est acide, et que c'est pour cela qu'elles apparaissent colorées d'une façon si intense avec des solutions aussi diluées de neutralroth.

Après avoir examiné une série de préparations de leucocytes qui n'ont phagocyté aucune substance étrangère, j'ai passé à l'étude de la coloration de leucocytes ayant englobé différentes matières.

Dans toutes mes expériences, la leucocytose était provoquée par l'injection intrapéritonéale de culture de bouillon chez des cobayes. Pour obtenir la phagocytose, tantôt j'introduisais 18 à 24 heures après la première injection, diverses substances, dans le péritoine, tantôt je mélangeais l'exsudat péritonéal avec différents produits destinés à être englobés, puis je rassemblais les leucocytes à l'aide de la centrifugation, comme le faisait aussi Plato. Tout d'abord, j'injectai dans le péritoine des cobayes du talc en suspension dans la solution physiologique de sel marin, et j'examinai ces leucocytes après le début de la phagocytose, soit 1/2-1 heure après l'introduction du talc. Un peu de l'exsudat péritonéal est mélangé avec une partie égale de solution de rouge neutre, et si l'on examine le mélange dans la goutte pendante, on voit que des parcelles de talc libres non phagocytées sont complètement incolores, tandis que les fragments inclus dans les leucocytes sont colorés en rouge vif, rappelant

la coloration des gonocoques englobés. Cette coloration se conservait durant 24-48 heures, et à côté des particules de talc colorés apparaissaient, avec le temps, dans les leucocytes des granulations colorées; puis, quand la cellule mourait, il y avait décoloration des particules de talc et des granulations teintées. Je ne veux pas m'arrêter pour le moment à discuter ce phénomène et je passe aux autres substances dont je me suis servi.

Des fragments de coton injectés dans la cavité péritonéale d'un cobaye étaient rapidement englobés par les leucocytes. Ces fragments colorés par le rouge neutre dans la goutte pendante, prenaient rapidement à l'intérieur des leucocytes une coloration rouge intense; les flocons de coton libres étaient faiblement colorés en jaune clair. Si l'on conservait cette préparation jusqu'à décoloration complète, on pouvait voir que les grosses fibres intracellulaires se désagrégeaient en fibrilles plus ténues, qui se divisaient à leur tour en fragments plus petits; finalement il y avait dans la cellule une quantité considérable de petites granulations nettement colorées et ne se décolorant qu'à la mort de la cellule.

J'ai fait aussi des recherches sur la coloration des bactéries mortes et phagocytées. Je me suis servi de 15 variétés et j'ai procédé comme dans les expériences précédentes. Le tableau microscopique était identique dans tous les cas; j'y reviendrai quand je parlerai de la coloration des bactéries vivantes englobées par les phagocytes.

Toutes les bactéries mortes se coloraient très faiblement par le rouge neutre; mais elles prenaient une coloration rouge intense quand elles étaient dans l'intérieur des phagocytes. Il est vrai que dans quelques cellules la coloration n'était pas très nette, mais si l'on examinait attentivement la cellule en question, on pouvait constater que sa vitalité n'était pas très prononcée et qu'elle succombait rapidement, sans doute à la suite de quelque avarie subie pendant les manipulations. A ce moment, les microorganismes morts, contenus dans son intérieur, se décoloraient complètement. Si l'on observe des microorganismes morts englobés par les phagocytes, on peut voir qu'après s'être fortement colorés, ils gonflent, puis se fragmentent en particules de plus en plus petites, mais restent toujours teintés. Les bactéries, tout comme les particules de talc et les flocons d'ouate,

sont colorées tant qu'elles restent dans le granuloplasme, mais dès qu'elles passent dans cette zone claire et homogène que forme l'hyaloplasme autour de la cellule, leur coloration disparaît aussitôt, et elles deviennent complètement transparentes. Puis, quand le courant intracellulaire ramène ces substances dans le granuloplasme, elles apparaissent de nouveau colorées.

Ces phénomènes étaient surtout intéressants à observer sur des phagocytes ayant englobé un filament de coton ou une chaînette de bactéridies charbonneuses dont une partie restait en dehors de la cellule. La partie englobée qui se trouvait dans le granuloplasme avait une coloration rouge, celle qui traversait l'hyaloplasme restait complètement incolore; enfin, la portion extracellulaire avait une coloration jaunâtre.

J'ai remarqué, dans toutes ces expériences, qu'au bout de 24 à 48 heures la décoloration des inclusions intracellulaires était complète; à ce moment les leucocytes sont morts ou sur le point de mourir. Quant à l'influence des agents nocifs agissant sur la cellule au point de vue du changement de coloration, j'en parlerai plus loin.

Lorsque les leucocytes ont englobé des bactéries vivantes, l'aspect des préparations n'est pas aussi simple, ni aussi homogène.

Dans le cas des bactéries mortes, toutes celles qui sont dans l'intérieur des phagocytes se montrent colorées; il n'en est pas de même avec les bactéries vivantes : très souvent à côté de bactéries colorées, d'autres restent incolores; à côté d'un microorganisme présentant une coloration intense, un autre est à peine teinté.

Je me suis servi des variétés microbiennes suivantes : bactéridie charbonneuse, premier vaccin charbonneux, bacillus subtilis, colibacille, bacille de la diphtérie, bacille de la grippe, vibrion du choléra, bacille du chancre mou, bacilles de la tuberculose humaine et aviaire, bactérie de Rabinovitch et quatre autre variétés de bacilles pseudo-tuberculeux.

Je choisissais, autant que possible, des cultures jeunes, pour éviter les formes dégénérées.

Si l'on injecte la culture charbonneuse virulente et récente dans le péritoine d'un cobaye auquel on a préalablement fait une

injection de bouillon stérilisé, et que l'on examine en goutte pendante, l'exsudat, additionné de rouge neutre, on peut voir, au bout de 15-30 minutes, que les bactéridies non englobées restent complètement incolores, tandis que les bactéridies englobées se colorent assez fortement en orangé avec reflet rouge brique. J'ai remarqué qu'il y a toujours un reflet rouge brique dans la coloration de toutes les substances phagocytées, de sorte que je ne mentionnerai plus ce fait jusqu'au moment où je parlerai des propriétés oxydantes que possède la cellule vis-à-vis de la substance qu'elle englobe.

Cette coloration devenait peu à peu plus faible et disparaissait par places au bout de 1-2-3 heures; sur d'autres, elle se conservait à peu près 24 heures; mais l'intensité de la couleur n'était pas aussi prononcée qu'avec les cultures charbonneuses mortes.

Je n'ai jamais constaté de multiplication des bactéridies charbonneuses englobées dans l'intérieur des leucocytes, après leur décoloration ou, ce qui revient au même, après la mort du leucocyte. Mais je considère ce phénomène comme parfaitement possible, car après la mort des globules blancs, les bactéries trouvent dans les corps leucocytaires un milieu de culture favorable, en même temps qu'elles ne subissent plus l'action destructive de la cellule vivante.

Au début de la décoloration, on ne distingue dans le leucocyte aucune modification morphologique, mais si l'on observe ce leucocyte un certain temps après que la décoloration s'est effectuée, on constate qu'il subit aussi des altérations.

On peut donc juger de la mort de la cellule d'après la décoloration de la substance englobée, qui se fait avant que cette cellule subisse des modifications morphologiques appréciables.

La coloration était beaucoup plus intense dans le cas où le cobaye recevait du premier vaccin charbonneux. La marche de la coloration et de la décoloration était la même qu'avec la culture virulente, mais il y avait une différence dans la rapidité de la décoloration.

La décoloration du vaccin n'était pas aussi rapide et la teinte était plus intense, ce qui peut s'expliquer parce que la bactéridie atténuée altère moins la vitalité du leucocyte que la bactéridie virulente.

Les bacilles du foin phagocytés et fortement colorés perdaient leur coloration au bout de 24-48 heures. Il en est de même pour le colibacille, les bacilles de la grippe, de la diphtérie, du choléra, du chancre mou ; leur coloration est beaucoup moins intense que celle du bacille du foin. Tandis que ceux-ci, dans l'intérieur des phagocytes, se colorent tous d'une façon intense et uniforme, on observe un autre phénomène avec les bactéries que nous venons de citer : certaines d'entre elles se colorent fortement, d'autres plus faiblement, et on peut même trouver des formes complètement incolores. Ces formes non colorées se rencontrent surtout avec le colibacille, plus rarement et parfois pas du tout, avec la bactérie du chancre mou. La même différence m'a surtout frappé quand j'ai étudié la phagocytose des bacilles vivants de la tuberculose et de la pseudo-tuberculose.

Ainsi, si l'on examine l'exsudat d'un cobaye auquel on a injecté des bacilles pseudotuberculeux ou des bacilles de la tuberculose aviaire, on constate que ces bacilles englobés par les leucocytes ont une teinte orangée et que celle-ci disparaît au bout de 24 heures, comme cela se passe pour les microorganismes qui n'ont pas d'influence prononcée sur les cellules.

Si, au contraire, on prend l'exsudat d'un cobaye auquel on a fait une injection intrapéritonéale d'une culture de bacilles de Koch, on observe alors un phénomène tout différent : les bacilles de la tuberculose englobés par les phagocytes n'ont qu'une coloration jaune paille; si l'on observe un leucocyte englobant un bacille de la tuberculose coloré, on peut constater sa décoloration complète au bout de 1, 2, 3 heures tout au plus. On peut dire que les leucocytes sont altérés et possèdent peu de vitalité. L'examen de la préparation donne l'impression que peu de bacilles sont englobés. Mais si l'on colore cet exsudat à la fuchsine phéniquée, puis au bleu de méthylène, on voit que les leucocytes ont englobé une quantité colossale de bacilles de la tuberculose, que ces derniers remplissent les cellules et que celles où l'on ne trouve qu'une ou deux bactéries sont rares.

Ainsi donc, quand le nombre des bacilles de Koch englobés par es phagocytes est considérable, leur action toxique sur la cellule est très prononcée, et il n'y a pas de coloration. Dans les cas, au contraire, où l'on n'en trouve qu'un ou deux, où ils n'ont pas

encore eu le temps de développer suffisamment leur action toxique pour atteindre les fonctions vitales des leucocytes, qui réagissent sur eux, aussi ils apparaissent colorés, il est vrai pour peu de temps.

Dans les leucocytes des cobayes, les bacilles de la tuberculose aviaire se colorent aussi bien que les bacilles de la pseudo-tuberculose. Mais quand on les injecte sous la peau d'un pigeon ou d'une poule et qu'ils sont englobés par les leucocytes de ces oiseaux, ils ressemblent parfaitement par leur coloration aux bacilles de la tuberculose humaine englobés par les leucocytes d'un cobaye.

Si l'on injecte des bacilles de la tuberculose humaine sous la peau d'un pigeon ou d'une poule, on voit que ces bacilles, qui se coloraient à peine dans les leucocytes des cobayes, prennent la couleur dans les leucocytes des oiseaux aussi bien que les bacilles de la pseudo-tuberculose ou les bacilles de la tuberculose aviaire englobés par les leucocytes des cobayes.

Ces expériences me permettent d'émettre l'opinion que la coloration par le rouge neutre des bactéries englobées par les leucocytes, qui est la conséquence des propriétés oxydantes des leucocytes, nous fournit le moyen de juger de l'immunité d'un animal vis-à-vis de telle ou telle espèce bactérienne.

Dans la description de la décoloration des bactéries englobées, j'ai toujours parlé des cas où la mort de la cellule était antérieure à celle de la bactérie. Mais les choses ne se passent pas toujours ainsi, et très souvent la mort de la bactérie précède celle du leucocyte qui l'englobe. Dans ces cas, si le phagocyte possède encore assez d'énergie vitale, on voit que la bactérie, quelle qu'elle soit, commence par se gonfler et par se colorer d'une façon plus intense. Si la bactérie est assez longue, malgré ce gonflement, elle conserve sa forme bacillaire, elle est seulement un peu plus épaisse. Mais si le bacille était court, il prend l'aspect d'un coccus.

Une fois le gonflement des bactéries produit, leurs modifications ultérieures suivent la même marche que celles des bactéries mortes, englobées par les phagocytes. Elles se désagrègent de plus en plus en donnant naissance à des petits amas fortement colorés qui rappellent un peu les granulations dans les leucocytes.

Après ces observations sur la coloration des substances organiques et inorganiques, et sur celles des bactéries vivantes et mortes, libres ou englobées, qui m'ont conduit à distinguer par la coloration l'état des éléments phagocytés, je vais exposer les expériences que j'ai faites sur la phagocytose des gonocoques.

Grâce à l'amabilité du corps médical de l'hôpital Ricord, j'ai pu prélever du pus provenant de plusieurs cas de blennorrhagie récente et de blennorrhagie chronique.

J'ai pu ainsi traiter par le rouge neutre des échantillons de pus recueillis depuis l'apparition de la sécrétion jusqu'à deux mois après.

Les observations sur le pus le plus ancien n'ont pas été continues, mais faites à intervalles assez longs. Je ne me charge pas de décider si le pus blennorrhagique d'une urétrite récente datant de 1 à 3 jours seulement se distingue nettement, par sa coloration au rouge neutre, du pus d'une urétrite de 1 à 3 mois. Je peux dire seulement qu'à mon avis on ne peut pas reconnaître, d'après la coloration par le neutralroth, une urétrite ancienne d'une urétrite récente. Ni le nombre des gonocoques libres, ni celui des gonocoques englobés et colorés ou incolores ne peuvent servir de base à un observateur attentif pour juger de l'âge d'une blennorrhagie. On peut observer les mêmes tableaux microscopiques aussi bien dans les urétrites de courte durée que dans les urétrites chroniques.

De même qu'on ne peut juger d'après le nombre de gonocoques libres et englobés de la date de l'urétrite, on ne peut rien dire d'après la durée de la décoloration, car les leucocytes de l'homme qui contiennent des gonocoques, se décolorent dans tous les cas dans un même laps de temps. L'organisme humain ne paraît pas acquérir d'immunité contre les gonocoques.

Lors même que la maladie dure depuis un certain temps, les leucocytes qui entrent en lutte avec les gonocoques, se comportent toujours de la même façon et ne manifestent pas une résistance spécifique comme cela s'observe dans beaucoup d'autres maladies infectieuses.

Les gonocoques libres et vivants d'une culture âgée d'un jour, ne fixent pas le rouge neutre en solution telle que je l'emploie. Les gonocoques morts se colorent, mais très faiblement. En résumé, ils se comportent vis-à-vis de la matière colo-

rante de la même façon que les autres microorganismes.

La plupart des gonocoques englobés par les leucocytes de l'homme sont colorés en rouge intense; à côté de ces formes fortement colorées on en trouve d'autres qui restent complètement incolores. Notons encore que plus un leucocyte renferme de gonocoques, plus on y rencontre des formes non colorées et que, dans les leucocytes qui ne contiennent que 2 ou 3 gonocoques, ceux-ci sont plus fortement teintés que ceux qui sont en grand nombre dans une même cellule.

Les gonocoques extracellulaires ne prennent pas de coloration du tout, ou bien seulement 1 sur 100 d'entre eux se colore faiblement en rouge. Si on laisse ces préparations dans une goutte pendante durant 24-48 heures, on peut voir l'apparition dans les leucocytes, à côté des gonocoques colorés, de granulations colorées, de sorte que certains leucocytes semblent complètement remplis de petites granulations rouges ; toute la cellule, excepté quelques petits interstices, paraît colorée en rouge intense. Peu à peu les gonocoques englobés par les phagocytes commencent à perdre leur coloration et, à la fin de la seconde journée, tous les leucocytes sont décolorés; sur quelques-uns seulement on observe encore un peu de coloration qui persiste indéfiniment.

Tel est le tableau que présente au microscope du pus urétral coloré par le rouge neutre; quelle que soit la durée de l'urétrite, le pus, coloré par ce procédé, ne se distingue en rien, au microscope, du pus d'une autre urétrite plus ancienne ou plus récente.

Les gonocoques englobés par les phagocytes ne sont nullement modifiés; ils conservent tout le temps leur forme en biscuit, même si l'on observe au microscope un seul et même leucocyte jusqu'à sa complète décoloration.

Après ces observations sur les leucocytes de l'homme contenant des gonocoques vivants, j'en ai fait d'autres sur les leucocytes ayant englobé des gonocoques morts. Pour cela, je prenais deux parties de pus blennorrhagique; dans l'une je tuais les gonocoques et je la mélangeais avec l'autre où les gonocoques et les leucocytes étaient vivants; je centrifugeais ensuite le mélange. J'ai pu alors observer le phénomène suivant : dans un seul et même leucocyte, une partie des gonocoques qui avaient été certai-

nement englobés par les leucocytes encore dans l'urètre, restaient non modifiés et conservaient leur forme caractéristique en biscuit; une autre partie de ces microorganismes, formée par des gonocoques morts et englobés, avaient un tout autre aspect : les gonocoques se gonflaient, perdaient rapidement leur forme caractéristique, se résolvaient ensuite en petits amas qui restaient toujours fortement colorés.

Dans mes expériences ultérieures avec les gonocoques, je procédais de la façon suivante : je provoquais chez les cobayes une leucocytose péritonéale par injection de bouillon, puis j'injectais dans le péritoine de ces animaux des cultures de gonocoques, les unes vivantes et les autres tuées, et du pus urétral qui contenait un nombre considérable de gonocoques. Dans tous ces cas, que les gonocoques injectés fussent morts ou vivants, le tableau microscopique était toujours le même. Les gonocoques, après s'être fortement colorés, gonflaient rapidement, perdaient leur forme caractéristique, se désagrégeaient en formant des granulations excessivement petites et très fortement colorées.

L'aspect était le même que lorsqu'on fait agir les leucocytes de l'homme sur des gonocoques déjà morts.

Ces faits sont analogues à ceux que j'ai observés dans mes recherches précédentes avec la tuberculose humaine et aviaire.

Là aussi on était frappé de ce que les bacilles de la tuberculose humaine se coloraient mal et ne se désagrégeaient pas dans les leucocytes de l'homme, tandis qu'ils se coloraient bien et se désagrégeaient dans les leucocytes des oiseaux. Inversement, les bacilles de la tuberculose aviaire se coloraient bien et gonflaient dans les leucocytes d'un mammifère, tandis qu'ils se coloraient faiblement et en petit nombre dans les leucocytes des oiseaux. Nous avons observé un phénomène analogue avec les gonocoques ; dans les leucocytes de l'homme les gonocoques englobés, tout en se colorant très fortement, ne se colorent cependant pas tous et ne se désagrègent pas complètement.

Dans les leucocytes d'un animal, réfractaire à l'infection blennorrhagique par injection intrapéritonéale, les gonocoques prennent une coloration intense, subissent rapidement toutes les modifications ultérieures, notamment le gonflement et la désagrégation. Cette coloration, qui s'effectue pendant l'examen microscopique, permet de juger du degré d'immunité que pos-

sède une espèce animale vis-à-vis tel ou tel microorganisme, et cela non pas tant d'après l'intensité de la coloration que d'après le degré des modifications que subit le corps englobé, et que cette coloration permet de constater. Si le corps englobé n'a pas d'influence trop nocive sur le leucocyte intact, la coloration s'y effectue rapidement et est très intense, comme on l'observe, par exemple, pour la coloration des particules de talc englobés; parfois les choses en restent là, et malgré la coloration intense, c'est-à-dire malgré la réaction oxydante très prononcée du leucocyte sur le corps englobé, la cellule n'est pas en état de détruire ce corps. Nous observons ce phénomène dans la phagocytose des gonocoques au cours de la blennorrhagie, où le leucocyte réagit contre le gonocoque englobé. Ceux-ci exercent aussi une action nocive sur la cellule sans cependant l'altérer profondément.

On voit donc que ces expériences, avec la matière colorante indiquent en quelque sorte l'immunité naturelle qui se manifeste par l'influence destructive des leucocytes sur les microorganismes qu'ils englobent. Les bacilles de la tuberculose, tout en étant englobés par les leucocytes des animaux, résistent bien à l'action de la cellule; aussi ne se colorent-ils que faiblement par le rouge neutre, et encore pas tous, et ils ne présentent pas de formes de destruction ultérieure.

Le gonocoque qui est plus modifié par les leucocytes, se teint fortement, mais l'action ne va pas jusqu'à la mort du microbe. De même celui-ci sécrète des produits nuisibles à la cellule sans arriver cependant à lui faire perdre sa vitalité.

Plato a attiré l'attention sur le fait suivant :

Si l'on injecte du pus blennorrhagique dans la cavité péritonéale d'un cobaye, chez lequel on a provoqué préalablement la leucocytose par injection de bouillon, on constate, au bout de quelque temps, dans l'exsudat formé, que les leucocytes du cobaye englobent les leucocytes humains morts. Il arrive que des leucocytes du cobaye absorbent à la fois des gonocoques libres dans le pus, et des leucocytes humains bourrés de gonocoques. Dans ce cas, le rouge neutre colore fortement les noyaux du leucocyte humain et les gonocoques qui viennent d'être saisis, tandis que les gonocoques contenus dans la cellule englobée restent incolores, de même que les noyaux de la cellule englobante.

Plato, en parlant de l'oxydation du neutralroth dans la substance englobée et de sa désoxydation dans l'élément englobant, ne donne pas d'explication suffisante de ce phénomène. L'absence de coloration du noyau de la cellule englobante est du reste très compréhensible. En effet, il n'y a pas d'autodestruction de la cellule, son noyau bien vivant n'est pas coloré. Quant aux autres éléments englobés, gonocoques, leucocytes contenant des gonocoques, ils ne sont que des corps étrangers et comme tels devraient naturellement se colorer. Ce phénomène se produit en effet pour les gonocoques et pour les noyaux des leucocytes phagocytés ; mais, d'après Plato, les gonocoques inclus dans la cellule englobée ne se colorent pas.

Je me suis demandé si la coloration des gonocoques n'était pas simplement masquée. Pour élucider cette question, je me suis servi d'une solution alcaline faible qui, pénétrant dans le leucocyte de la périphérie vers le centre, amène des changements dans l'aspect de la préparation. En diffusant, l'alcali neutralise le milieu acide qui entoure les inclusions, et on voit que ce sont les gonocoques inclus dans la cellule englobante qui se décolorent tout d'abord, tandis que le noyau et les gonocoques de la cellule englobée apparaissent fortement colorés.

Un peu plus tard survient la décoloration soit des gonocoques de la cellule englobée, soit des noyaux. Si ce sont les noyaux qui sont décolorés les premiers, on peut voir que les gonocoques de la cellule englobée sont teintés et qu'ils perdent peu à peu leur couleur sous l'action de l'alcali.

En me servant dans ces expériences de solutions d'alcalis de concentrations diverses, je suis arrivé à la conclusion que ce sont les solutions de potasse à 0,05 0/0 qui conviennent le mieux à cet effet. Avec des solutions d'alcalis de cette concentration, la décoloration s'effectue en 15 ou 30 minutes ; pendant ce temps on peut observer tous les changements de coloration dont je viens de parler. 1 goutte d'exsudat, déjà colorée par le rouge neutre, était mise sur une lame porte-objet avec 1 gouttelette de la solution alcaline, et j'examinais la préparation en goude, pendante.

Si l'on fait usage, pour la coloration des gonocoques, de solutions plus concentrées de rouge neutre, en prenant par exemple 10, 20, 30, 40 et même 50 c. c. d'une solution aqueuse saturée à froid

pour 100 c. c. d'une solution physiologique de sel marin, on voit que ces solutions de neutralroth ne se distinguent en rien des autres couleurs d'aniline, à cause dela coloration foncée qui masque la préparation.

Il faut dissoudre la matière colorante dans le liquide physiologique, car une solution dans l'eau distillée a une influence funeste sur la cellule et modifie sensiblement la coloration intravitale des substances englobées par les phagocytes.

Dans toutes les expériences que je viens de décrire, les cellules phagocytaires n'ont subi aucune influence étrangère nocive, sauf celle de la subtance englobée par les phagocytes. Mais déjà Plato a attiré l'attention sur ce fait, que si l'on soumet les phagocytes soit à l'action d'une température élevée, soit à celle du sérum d'un animal d'une autre espèce, ou bien encore si l'on diminue par la quinine les propriétés phagocytaires des leucocytes, on peut constater que la vitalité de la cellule s'affaiblit et que la coloration des corps persiste moins longtemps que dans le cas où les agents nocifs font défaut.

En traitant les leucocytes contenant des inclusions colorées par une température élevée, ou par différents sérums, ou encore en diminuant leur résistance au moyen de la quinine, j'ai pu constater dans tous les cas que plus les leucocytes subissent l'influence nocive, plus la décoloration des inclusions survient rapidement. Si l'on détruit par la quinine les propriétés phagocytaires des leucocytes, on peut voir que la coloration ne s'effectue presque pas à l'intérieur de ces leucocytes. L'effet est le même que l'on fasse agir une température élevée, un sérum altérant, ou même si on emprunte les leucocytes à un animal affaibli; dans tous ces cas, les propriétés phagocytaires et oxydantes des leucocytes sont diminuées.

Cette diminution de vitalité des leucocytes s'observe encore suivant que la phagocytose s'est faite *in vivo* ou *in vitro*.

Des bactéridies charbonneuses sont injectées dans le péritoine d'un cobaye, une autre portion de la même culture de charbon est mélangée *in vitro* à un exsudat riche en leucocytes; puis, on centrifuge et on examine simultanément en gouttes pendantes le liquide retiré du péritoine et celui resté en dehors de l'organisme.

Il y a une différence dans la coloration : les bactéridies charbonneuses phagocytées *in vivo* se colorent un peu plus que les bactéridies phagocytées *in vitro*. Cette différence de coloration, tout en n'étant pas très grande, indique néanmoins que la moindre altération des leucocytes modifie leur action sur les substances phagocytées.

En dehors de l'organisme vivant, ils perdent leurs propriétés oxydantes vis-à-vis de la matière englobée. Il est très possible que les leucocytes de l'homme se trouvent dans une situation analogue vis-à-vis des gonocoques. Restés à l'intérieur de l'organisme, ils auraient pu développer plus d'énergie destructive. On pourrait ainsi expliquer, en partie du moins, ce fait clinique que malgré la très grande fréquence de la blennorrhagie chez l'homme, les cas d'endocardites, d'arthrites et d'autres lésions indiquant une infection gonococcique générale de l'organisme, sont excessivement rares et n'ont commencé à être connus que récemment.

Nous avons déjà examiné la nature des granulations qui se colorent dans les leucocytes n'ayant certainement rien englobé, granulations que la plupart des auteurs sont d'accord à considérer comme résultat des échanges nutritifs ou, en d'autres termes, comme des substances étrangères à la structure de la cellule. Me basant sur mes recherches personnelles, je me rallie aussi à cette opinion en ajoutant qu'en effet on ne peut pas supposer que la cellule vivante, possédant toutes ses propriétés vitales, ait une tendance à l'autodestruction, à l'autooxydation.

Je passe maintenant à l'opinion de Plato qui veut que seules les substances albuminoïdes phagocytées se colorent à l'intérieur de la cellule. Il est difficile d'admettre que cette première conclusion de Plato soit péremptoirement démontrée, car j'ai vu une belle coloration intense par le rouge neutre des particules de talc et des flocons d'ouate, qui n'ont rien de commun avec les substances de nature albuminoïde.

Toute substance phagocytosée se colorant par le rouge neutre, qu'elle soit morte ou vivante, organique ou inorganique, se trouve à l'intérieur du leucocyte dans un milieu oxydant et se tinte en rouge.

Examinons maintenant l'opinion de Plato sur l'origine

de la coloration? D'après cet auteur, la coloration se produit grâce à la diffusion de la matière colorante dans la substance englobée; cette matière colorante s'y accumule en beaucoup plus grande quantité que dans la cellule englobante, et en plus elle subit la transformation de leuco-produit en oxy-produit. Cette interprétation pouvait être admise dans les expériences où Plato employait des substances qui se laissent imprégner par la couleur, comme les matières organiques mortes ou encore les bactéries vivantes qui sont pénétrées moins facilement; mais elle devient insuffisante à expliquer la coloration des particules de talc à l'intérieur du leucocyte.

Le talc, corps cristallin, n'absorbe pas la couleur, et c'est en me basant sur ce fait que je voudrais donner une explication de la coloration des substances phagocytées. Je dois ici répéter ce que j'ai déjà dit plus haut, qu'avec une seule et même solution de neutralroth, l'intensité de la coloration dépend de l'acidité et de l'alcalinité du milieu coloré.

On comprend que les leucocytes, qui possèdent naturellement une réaction faiblement alcaline, ne doivent pas se colorer par le rouge neutre, et en effet ils ne se teintent pas. Si le talc englobé se colore, c'est que chaque fragment est entouré d'une zone de sécrétion acide produite par le leucocyte. C'est justement cette zone acide autour du fragment de talc qui se colore fortement par le rouge neutre présent dans la cellule. Le granuloplasme semble seul posséder les propriétés oxydantes, l'hyaloplasme n'y prend aucune part. Il va sans dire que si la substance englobée par les phagocytes se laisse imprégner pas la sécrétion acide qui l'entoure, l'intensité de la coloration sera augmentée.

Avec cette explication, la décoloration, qui se produit pendant la mort de la cellule, est beaucoup plus facile à interpréter.

Le leucocyte, une fois mort, n'élabore plus de sécrétion acide; mais alors apparaissent les phénomènes de diffusion à l'intérieur même du leucocyte, et la réaction, naturellement alcaline de la cellule, neutralise le milieu acide autour de l'inclusion qui se décolore.

De la rapidité de la mort de la cellule dépend aussi la rapidité de la décoloration; de même la décoloration se produit dans l'hyaloplasme, lequel ne possède pas de propriétés oxy-

dantes. Pour les substances qui permettent la pénétration de la matière colorante dans leur intérieur, j'admets donc la coloration dans le sens propre du mot, quand la matière colorante se combine à la substance qu'on colore; mais je ne peux pas en dire autant des substances qui ne permettent pas la diffusion, comme, par exemple, le talc et les bactéries vivantes où il n'y a, à mon avis, qu'une coloration apparente, laquelle dépend de la sécrétion acide du leucocyte entourant le corpuscule inclus et changeant la couleur du neutralroth qui s'y trouve. En effet, une bactérie vivante, qui se trouve en dehors du leucocyte et qui oppose une résistance à la diffusion, ne se colore pas du tout, tandis qu'une bactérie morte, qui se trouve dans les mêmes conditions, se colore, grâce à la diffusion, faiblement il est vrai, mais se colore tout de même. Le talc se comporte de la même façon que la bactérie vivante. Je peux dire que le rouge neutre possède la propriété de changer l'intensité de la couleur de ses solutions, suivant la réaction alcaline ou acide du milieu ambiant, et qu'il ne peut être comparé à d'autres couleurs d'aniline.

M. Metchnikoff[1] pense que les couleurs d'aniline ne peuvent colorer dans les leucocytes que des bactéries mortes. Cette opinion sur l'action des couleurs basiques d'aniline peut aussi s'appliquer, à mon avis, au neutralroth, qui ne diffuse pas et ne précipite pas dans les bactéries vivantes; mais avec cette matière colorante, grâce à sa propriété spécifique de changer de couleur suivant la réaction du milieu ambiant, on obtient une coloration certaine des bactéries même vivantes. L'intensité de la coloration dépend non pas de la diffusion et de la concentration du rouge neutre dans l'inclusion, mais des propriétés oxydantes des leucocytes; cela est surtout apparent dans les cas où les facultés vitales des leucocytes sont affaiblies soit par la température élevée, soit par l'action du sérum d'autres animaux, ou par les poisons élaborés par les bactéries englobées par les phagocytes. Ainsi, nous voyons dans le cas de phagocytose des bacilles de Koch, par exemple, que les bacilles, tout en prenant la matière colorante, sont faiblement colorés et pas tous, en d'autres termes que les bacilles, en diminuant les propriétés vitales de la

1. METCHNIKOFF, Ueber die Immunität bei Infectionskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Cellulartheorie, *Lubarsch. Ostertag. Ergebnisse*, I, 1896.

cellule, se trouvent dans un milieu faiblement oxydant ou n'oxydant pas du tout. Nous pourrons constater facilement un autre fait en colorant le pus blennhoragique par le rouge neutre. Dans ce cas, quoique l'action toxique du gonocoque sur les leucocytes soit minime, puisque la coloration est intense, les leucocytes ne possèdent pas assez d'énergie pour que tous les gonocoques englobés soient colorés. Si le leucocyte renferme peu de gonocoques, 1, 2, 3 seulement, ces gonocoques se colorent tous; mais, s'ils sont en nombre considérable, on peut constater qu'il y a parmi eux des gonocoques non colorés. Or, comme il découle de nos expériences que les microorganismes morts se colorent plus fortement, nous pouvons supposer que les formes non colorées représentent des gonocoques plus résistants, ayant des propriétés vitales plus prononcées.

Ces gonocoques peuvent, peut-être, par eux-mêmes neutraliser le milieu ambiant acide sécreté par les cellules, et cette neutralisation paralyserait en partie l'action destructive des leucocytes sur les gonocoques qui y sont inclus.

En colorant différentes cellules de l'organisme animal, j'ai pu voir que le noyau de certaines d'entre elles prend une légère coloration claire et que le proloplasma reste incolore, tandis que dans les autres le noyau prend une coloration rouge sombre. Partant de ce fait que les substances qui possèdent une réaction acide, peuvent se colorer fortement par le rouge neutre, je peux conclure que les noyaux cellulaires ont une réaction acide par comparaison avec le protoplasma, et que le degré d'acidité des noyaux des différentes cellules n'est pas le même; la réaction la moins acide s'observe dans les noyaux des cellules endothéliales, la plus acide dans ceux des cellules nerveuses.

Il serait certainement intéressant de définir chimiquement l'acide élaboré par le leucocyte, mais dans l'état actuel de la science nous n'avons pas encore de procédés pour exécuter de telles recherches. On peut seulement s'approcher plus ou moins de la solution. Me basant sur le fait que la nuance de la couleur des substances englobées par les phagocytes, et colorées par le rouge neutre, ne ressemble nullement à la couleur d'un mélange de cette matière colorante et des acides minéraux, où le reflet est violet, je suis enclin à supposer que l'acide élaboré par

les leucocytes doit être voisin des amido-acides ; en effet, les combinaisons de ces derniers (la leucine, par exemple.) avec le rouge neutre ont une coloration rouge avec reflet rouge brique, semblable à celle que nous avons observée pendant la coloration des substances phagocytées. Mais il n'est pas facile de démontrer la probabilité de cette hypothèse.

Sans vouloir préjuger de l'avenir du rouge neutre, je crois que les observations déjà réunies sur ce réactif, ont un intérêt notable et que les observations ultérieures ne feront qu'augmenter nos connaissances sur ce chapitre très intéressant des propriétés vitales des éléments cellulaires en général et de leur lutte pour l'existence en particulier.

En terminant mon travail, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon très honoré maître, M. le professeur Metchnikoff, qui m'a suggéré ce sujet d'études ; je le remercie de sa direction éclairée, de ses savants conseils et aussi de l'intérêt si bienveillant avec lequel il a toujours suivi mes recherches.

Nous prions M. le docteur A. M. Besredka, qui ne nous a jamais refusé ses conseils expérimentés durant tout le temps de notre séjour au laboratoire, d'accepter également nos meilleurs remerciements.

CONCLUSIONS

1. Dans les leucocytes vivants, toutes les substances phagocytées se colorent par le rouge neutre (1 c. c. de solution de rouge neutre saturée à froid pour 100 c. c. d'une solution physiologique de sel marin).

2. Les granulations qui se colorent dans les leucocytes vivants, ne sont autre chose que des produits des échanges nutritifs ou des résultats de la sécrétion de ces leucocytes.

3. La coloration par le rouge neutre dépend des propriétés oxydantes des phagocytes.

4. La durée et l'intensité de la coloration des substances englobées par les phagocytes dépend des propriétés vitales de ces phagocytes et de l'action plus ou moins nocive qu'exerce sur eux la substance englobée.

5. L'hyaloplasme ne possède pas des propriétés oxydantes ou, ce qui revient au même, des propriétés colorantes.

6. A la mort de la cellule, le milieu qui entoure l'inclusion est neutralisé et cette inclusion se décolore.

7. Tous les facteurs qui affaiblissent la vitalité de la cellule ont une action analogue sur la coloration.

8. La coloration des cellules vivantes par des solutions plus concentrées de rouge neutre ne se distingue en rien de la coloration par les couleurs basiques non toxiques d'aniline.

9. La substance acide, élaborée par les leucocytes, semble être voisine des amido-acides.

10. La coloration des gonocoques vivants ou morts, englobés ou non par les phagocytes, ne diffère en rien de la coloration d'autres bactéries par le rouge neutre.

SUR LES CILS COMPOSÉS

Par E. MALVOZ

Avec la planche X.

Travail du laboratoire de l'Institut de Pathologie et de Bactériologie de l'Université de Liége.

En 1890, Lœffler [1], examinant une préparation de bacilles du charbon symptomatique traitée par la nouvelle méthode de coloration des cils, qu'il venait de découvrir, ne fut pas peu surpris d'y voir, à côté des microbes et de leurs flagellas, des formations toutes particulières, qui frappèrent vivement son attention. C'étaient de longues torsades, se résolvant à leurs extrémités en de fines spirales et traversant souvent tout le champ du microscope. Ces torsades se voyaient même dans les préparations non colorées. Leurs réactions colorantes étaient les mêmes que celles des cils proprement dits.

Lœffler les considéra comme des cils détachés des microbes et réunis en de véritable tresses, constituées par l'agglomération de nombreux flagellas. Il chercha en vain ces formations chez d'autres microbes, ce qui le portait a croire que c'était là quelque chose de spécial au bacille du charbon symptomatique.

Mais peu de temps après, Sakharof [2] décrivait les mêmes torsades dans une culture d'un bacille qu'il avait isolé des selles d'un cholérique, et qu'il nomma *bacillus asiaticus*. Ces formations étaient, comme celles de Lœffler, visibles aussi bien à l'état incolore que dans les préparations traitées par les mordants et les réactifs colorants des cils proprement dits ; Sakharof considère ces spirales comme des ficelles composées de cils.

Ce fut ensuite Novy [3] qui retrouva des éléments semblables dans des préparations colorées d'un bacille particulier de la famille du microbe de l'œdème malin.

De notre côté, travaillant avec M. Wathelet, nous trouvions, véritablement par hasard, dans une culture sur gélose, vieille de

1. Untersuchungen über die Beizung und Färbung der Geisseln, *Centralblatt für Bakteriologie*, vol. VII, n° 20.

2. Sakharof, Cils composés chez une bactérie trouvée dans les selles d'un cholérique, *Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1893.

3. Novy, Ein neuer anaerober Bacillus des malignen Oedems, *Zeitschrift für Hygiene*, 1894, t. XVII, p. 209.

2 jours, d'un bactérium coli isolé des selles typhiques, des spirales rappelant celles que Lœffler avait décrites, mais plus développées et plus typiques encore.

Ces éléments se trouvaient en assez grande abondance dans des préparations colorées par la méthode de Lœffler, tantôt isolés, tantôt réunies en véritables amas de spirales. Le professeur Nuel, qui eut l'occasion de voir ces préparations à notre laboratoire, fut frappé de la ressemblance de ces formations avec des éléments spiralés qu'il venait de découvrir dans des cornées malades : il voulut bien en faire une étude microscopique très serrée dont il présenta les résultats à l'Académie de Belgique [1].

Laissant de côté cette question des altérations spéciales de la cornée dans certaines maladies et des éléments particuliers qu'y a décrits M. Nuel, nous retenons, de la description qu'a faite le savant histologiste de nos préparations, qu'il ne peut rester le moindre doute sur la nature ciliaire de ces spirales. On voit, en effet, toutes les transitions entre de toutes petites spirales, dont les dimensions ne dépassent guère celles d'un cil ordinaire, et des spires géantes traversant tout le champ du microscope.

Dans ces éléments énormes la disposition spiralée peut ne pas sauter aux yeux, mais en les étudiant plan par plan, la vis micrométrique à la main, on s'assure facilement qu'il s'agit bien d'un filament disposé en spirale et dont les divers tours de spire augmentent progressivement et graduellement de dimension, en même temps qu'ils se serrent de manière à se toucher. Ils circonscrivent ainsi un fuseau qui, suivant la comparaison de M. Nuel, rappelle tout à fait certains blocs de tabac à mâcher, sauf qu'il n'y a qu'une seule couche de spires circonscrivant un espace central fusiforme, occupé par une masse dont la nature est difficile à préciser.

Ces spirales ont été vues dans la suite par divers observateurs, notamment par Fischer, chez d'autres microbes.

On n'est pas encore fixé sur leur mode de formation. M. Nuel et d'autres observateurs les considèrent comme constituées par un seul cil détaché du bacille, ayant vécu d'une vie

1. Nuel, D'une maladie microbienne de la cornée, *Bulletin de l'Académie de médecine de Belgique*, 1893.

indépendante et ayant acquis ensuite des dimensions colossales, d'où la dénomination de « cils géants » qui leur a été donnée.

Mais pour d'autres savants il s'agit de paquets de cils; ceux-ci, après s'être détachés des microbes, se sont entortillés, mais avec une telle régularité qu'il en est résulté de véritables spirales.

C'est, nous paraît-il, Migula [1] qui a fourni l'explication la plus satisfaisante de ces formations bizarres. Suivant ce savant observateur, il est inévitable que les cils d'un microbe, étant donné le peu d'espace dont les bacilles disposent dans un milieu de culture, s'entremêlent parfois avec les cils d'un autre bacille. Deux cils n'arrivent pas toujours à se démêler et, ainsi unis accidentellement, les bacilles continuant à se mouvoir, il arrive un moment où il faut bien que l'un des cils se détache de l'un des microbes, restant fixé à l'autre cil.

Il est tout naturel qu'habituellement le cil détaché se fixe plutôt à la partie médiane ou à l'extrémité libre de l'autre cil, de là l'allongement de ce dernier. Dans ces conditions, ce cil ainsi allongé, par la superposition d'un autre flagellum, et continuant à exécuter ses mouvements spiraloïdes, a plus de chances encore que précédemment de s'entremêler avec l'un ou l'autre cil d'un autre bacille, qui se détache à son tour et reste appliqué sur la petite torsade déjà constituée. De nouveaux cils venant encore s'ajouter aux précédents et la petite masse continuant à tourbillonner, il se forme bientôt des tresses de cils qui finissent par se détacher des bacilles et restent libres dans le liquide. On comprend très bien de cette manière, que l'on puisse observer, dans une préparation, toutes les transitions entre de petites spirales formées de quelques cils entortillés et de longues spires qui en renferment un très grand nombre à cause des superpositions successives de cils détachés qu'elles entraînent avec elle. L'expression de « cils composés » paraît donc plus exacte que celle de « cils géants ».

Si nous nous sommes décidé à publier cette observation, c'est d'abord que ces cils composés n'avaient pas encore été signalés chez le *bacterium coli*, mais c'est surtout à cause des magnifiques photogrammes que M. Albert Dubois, notre assistant, a réussi a en obtenir et qui montrent mieux que toutes

1. *System der Bakteriën*, vol. I, 1897, p. 127.

les descriptions la beauté et la régularité de ces formations, ainsi que les dimensions colossales qu'elles présentent parfois par rapport aux bacilles eux-mêmes. On n'a pas encore publié jusqu'à présent des figures aussi démonstratives (voir planche X, fig. I et II). La fig. I a été obtenue au moyen de l'objectif. E, oculaire à projection n° 2 de Zeiss ; la fig. II, idem, avec l'objectif apochromatique immersion homogène 20 millimètres et l'oculaire à projection n° 2.

Sur la dissociation des propriétés agglutinante et sensibilisatrice
DES SÉRUMS SPÉCIFIQUES

Par le Dr Albert DUBOIS

Travail du laboratoire de l'Institut de Pathologie et de Bactériologie de l'Université de Liége.

Identifiées encore par quelques observateurs, les substances spécifiques des sérums antimicrobiens ou antihématiques, qui constituent les agglutinines et les sensibilisatrices ou fixateurs, sont de plus en plus considérées comme bien distinctes, malgré certaines propriétés communes, telles que la résistance au chauffage à 56°, à la putréfaction, à la lumière, etc., qui les distinguent des alexines ou cytases des sérums. Un des principaux faits qui ont été invoqués contre les partisans de l'identité des agglutinines et des fixateurs est la découverte, par Bordet et Gengou[1], de sérums contenant des sensibilisatrices spécifiques à la période de convalescence de la fièvre typhoïde, mais dépourvus de ces agglutinines si abondantes pendant le cours même de la maladie.

Nous sommes parvenu à dissocier plus nettement encore les deux anticorps spécifiques, en étudiant comparativement les propriétés du sérum obtenu en injectant d'une part des hématies intactes, de l'autre des globules rouges préalablement chauffés à 115°. On sait qu'en traitant un animal par les globules du sang d'un autre animal, le sérum du premier devient agglutinant et hémolytique pour les hématies du second, en d'autres termes ce sérum renferme une proportion considérable d'agglutinines et de sensibilisatrices spécifiques, qui, avec l'aide de l'alexine du sérum normal frais, produisent la destruction des globules. Mais on n'avait pas encore recherché ce qui se produit quand, au lieu d'injecter des hématies intactes, on introduit des globules rouges profondément modifiés par un chauffage dans la vapeur à 115°.

Nous avons réalisé ces expériences de la façon suivante. Il ne fallait pas songer à chauffer simplement du sang complet de poule (c'est l'animal que nous avions choisi pour ces essais, les

1. Bordet et Gengou, Substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens, *Annales Pasteur*, mai 1901.

hématies d'oiseaux se prêtant très bien à l'étude de l'hémolyse). En effet, du sang défibriné, soumis à 115°, se prend en une masse impossible à injecter. Mais si on délaie les hématies de poule, préalablement bien lavées dans l'eau physiologique, pour les débarrasser des autres éléments du sérum, dans une proportion convenable d'eau salée à 9 0/00 (généralement 20 c. c. d'eau pour 3 c. c. d'hématies), on peut chauffer l'émulsion dans la vapeur à 115° pendant un quart d'heure et obtenir un liquide, trouble et floconneux il est vrai, mais se prêtant bien à une injection, surtout si l'on a soin d'agiter énergiquement et longtemps le flacon qui les contient. Au microscope, les hématies de poule chauffées sont encore reconnaissables au sein des flocons jaune brunâtre de l'émulsion. Nous avons injecté cette émulsion à un lapin sous la peau de la cuisse, en même temps que nous traitions, de la même façon un témoin par une émulsion d'hématies préparées de la même manière (mêmes proportions, etc.), mais non chauffées. La résorption des flocons de globules chauffés, s'est faite très facilement et très rapidement sans inflammation locale.

Les injections ont été renouvelées 3 fois, à 8 jours d'intervalle. Le sang des lapins a été recueilli 8 jours après la dernière injection.

Le sérum frais du lapin, qui avait été traité par les hématies non chauffées de poule, produisait en quelques minutes *in vitro* la destruction des hématies fraîches lavées à la turbine et émulsionnés en eau physiologique.

Au contraire, le sérum frais du lapin qui a reçu les hématies chauffées à 115° ne produisait pas la moindre hémolyse, même après un contact de 24 heures.

En chauffant le sérum du second animal à 56° pour le débarrasser de son alexine, et en l'additionnant ensuite d'alexine très fraîche de lapin, on ne constatait pas davantage de pouvoir hémolytique sur les hématies de poule, tandis que le sérum chauffé du premier lapin montrait, dans les mêmes conditions, une forte action destructrice sur les hématies.

Le sérum du lapin traité par les hématies de poule chauffées à 115° ne renferme donc pas de sensibilisatrices spécifiques.

Contient-il des agglutinines ?

Le sérum du lapin injecté d'hématies non chauffées agglutinait celles-ci jusqu'au titre de 1/80, mais le sérum de l'autre

lapin renfermait lui aussi une assez forte proportion d'agglutinines, produisant encore la floculation des hématies au titre de 1/20. Il se produit donc moins d'agglutinines, toutes choses égales d'ailleurs, quand on injecte les globules très altérés par la chaleur, mais il s'en produit une certaine proportion, c'est là le fait essentiel.

Et ces agglutinines ne sont pas des anticorps banaux élaborés à la suite de l'excitation de l'organisme par les substances de l'émulsion chauffée : ce sont des substances qui n'agglutinent que les hématies de poule et nullement celles d'autres animaux, tels que le cobaye, le lapin, etc., ainsi que nous nous en sommes assuré.

M. Defalle, au laboratoire de M. Malvoz, a observé, de son côté, que les microbes tels que les bacilles typhiques, mycoïdes, mesentericus, etc., chauffés à 115°, confèrent également au sérum un certain pouvoir agglutinant; mais les sensibilisatrices n'apparaissent pas dans ces conditions alors qu'elles sont très faciles à décéler après l'injection de microbes non chauffés.

Au contraire si, comme l'a fait M. Malvoz, on injecte des éléments comme des levures, qui possèdent une capsule différenciée très résistante, on obtient, même après résorption des levures chauffées à 115°, à la fois des agglutinines et des sensibilisatrices spécifiques pour ces éléments [1]. M. Defalle est arrivé au même résultat en injectant des spores qui, elles aussi, ont une paroi très résistante.

Un autre fait que l'on peut constater après l'injection d'hématies de poule chauffées à 115°, c'est l'absence de pouvoir précipitant du sérum de l'animal injecté sur le sérum de poule. Nous avons inoculé deux lapins comparativement, l'un avec des hématies bien lavées de poule et intactes, l'autre avec des hématies, en même proportion, lavées et chauffées à 115°. Le sérum du premier produisait un fort précipité dans le sérum de poule, tandis que l'autre laissait ce sérum parfaitement limpide même après quarante-huit heures.

Ce résultat peut être invoqué contre les auteurs qui soutiennent l'opinion que la formation de précipités dans les sérums est la condition *sine qua non* de l'agglutination, puisque le sérum

1. Malvoz. Le Diagnostic des maladies infectieuses par les anticorps microbiens, *Annales de la Société médico-chirurgicale* de Liége, 1901.

d'un animal traité par des globules chauffées à 115° est agglutinant et non précipitant, alors que celui de l'animal témoin, qui a reçu les mêmes globules non chauffés, est à la fois précipitant et agglutinant. Bordet était arrivé à la même constatation, mais par des expériences d'une autre nature [1].

On remarquera que dans nos essais l'injection des hématies lavées a été suivie de l'apparition de précipitines dans le sérum. Ce résultat diffère de celui qui a été obtenu par d'autres observateurs. Il faut en chercher la cause, semble-t-il, dans les conditions particulières où nous nous sommes placé : le sang de poule, immédiatement après sa récolte, était défibriné par agitation avec des perles de verre, lavé plusieurs fois à la turbine au moyen d'eau physiologique, puis les hématies étaient étendues de 20 c. c. d'eau salée pour 3 c. c. de globules. On a fait 5 injections de ce mélange de 8 en 8 jours.

1. Bordet, *Annales Pasteur*, 1899, page 233.

ERRATA

Errata du numéro 8 (août) 1902 :

Travail de W. Defalle (enveloppe des microbes dans l'agglutination) : page 598, lignes 30 et 36, au lieu de : eau salée à 9 0/0, lire : à 9 pour mille. — Page 610, ligne 22, au lieu de : levures moins digérées, lire : levures non digérées.

Travail de E. Malvoz (fixateur du sérum normal de chien) : page 627, ligne 16, au lieu de : eau salée à 9 0/0, lire : eau salée à 9 pour mille. — Page 628, ligne 12, lire : microbes du charbon, au lieu de : microbes.

Les deux travaux viennent des laboratoires de l'Institut de Pathologie et de Bactériologie de l'Université de Liége.

RECHERCHES SUR LE MICROBE DE LA "LOQUE",

MALADIE DES ABEILLES

Par le Dr Ul. LAMBOTTE

Travail du laboratoire de l'Institut de Pathologie et de Bactériologie de l'Université de Liége.

Comme les vers à soie, dont les maladies furent l'objet des études préférées de Pasteur, les abeilles, ces autres insectes travailleurs, paient leur tribut à des infections variées, parmi lesquelles la *loque* est la plus redoutée des apiculteurs.

Cette maladie est connue depuis des siècles, et au dire de Francis C. Harrison [1], qui a publié la bibliographie la plus complète que nous possédions sur la loque, les anciens, grands éleveurs d'abeilles, redoutaient déjà cette véritable peste des ruchers.

Tous les apiculteurs savent bien reconnaître la loque, qui frappe de préférence les larves en voie de développement. On reconnaît facilement, dans une ruche, les cellules renfermant les larves malades, à la coloration plus foncée de l'opercule, qui est déprimé vers le centre et percé généralement d'une petite déchirure due, croit-on, à l'échappement des gaz développés au sein de la larve malade. En brisant l'opercule, on trouve, au lieu d'une belle larve opaline bien vivante, une masse flasque, jaune ou jaune brunâtre, noirâtre même, à un stade plus avancé de la maladie; cette larve malade est visqueuse, filante et dégage une odeur nauséabonde, spécifique de la loque. Les ravages que cette maladie exerce dans les ruches peuvent être très considérables.

Dans les circonstances les plus favorables, lorsque les abeilles sont bien vigoureuses, on les voit arracher les parois des cellules contenant les larves malades et se livrer à leur nettoyage complet en emportant au dehors les produits morbides; bientôt, elles rebâtissent de nouvelles cellules et la maladie semble s'arrêter. Mais si celle-ci prend de l'intensité,

1. The foul brood of Bees, « Bacillus Alvei », *Centralblatt fur Bakteriologie*, 1900. Pages 421 et 513 (Zweite Abtheilung).

ou bien si les abeilles ne sont pas très vigoureuses, on les voit s'agiter au trou de vol, véritablement désespérées, et bientôt elles renoncent à butiner. La maladie, au dire des apiculteurs, pourrait se propager de ruche en ruche et de localité en localité. Il est inutile d'insister sur la perte considérable que constitue une invasion de loque dans un rucher, la mortalité du couvain amenant la dépopulation, et la reine, de son côté, ne trouvant plus de place pour la ponte.

On considère généralement la loque comme due à un bacille tout particulier, spécifique, qui a fait pour la première fois l'objet d'une étude véritablement scientifique vers 1885. Ce fut Watson-Cheyne et Cheshire qui découvrirent dans les larves loqueuses des bacilles qu'ils isolèrent et cultivèrent, et auxquels ils donnèrent le nom de *Bacillus alvei* [1]. Ils reconnurent que ce microbe donnait des spores presque aussi grosses que les bâtonnets eux-mêmes. Le *bacillus alvei* peut être cultivé facilement sur gélatine, gélose, sérum, lait, pomme de terre, etc.

Ce microbe fut bientôt accepté par tous ceux qui s'occupent d'apiculture et on le considère comme un bacille nettement spécifique, essentiellement pathogène au même titre que les bacilles de la peste et du choléra dans l'espèce humaine, n'envahissant les larves qu'après avoir été apporté du dehors dans la ruche par une véritable infection externe.

La loque n'a cessé de préoccuper les apiculteurs et de faire l'objet de discussions passionnées au sein de leurs journaux et de leurs congrès : c'est que l'étude bactériologique de Watson-Cheyne et Cheshire est loin d'avoir résolu une foule de points concernant l'étiologie de cette maladie. Bien des faits d'observation d'épidémies loqueuses, survenant en dehors de toute infection de voisinage, ne reçoivent pas une interprétation satisfaisante si on admet la spécificité absolue du *bacillus alvei*.

Aussi, en 1900, la Société d'Apiculture du bassin de la Meuse sollicita-t-elle un crédit du ministère de l'Agriculture de Belgique, en faveur de l'Institut de bactériologie de l'Université de Liége, pour une nouvelle étude scientifique de la loque. Ce crédit fut très généreusement accordé, et M. Malvoz, directeur

1. The pathogenic History under cultivation of a new Bacillus (*B. alvei*). *Journal of the royal Microscopical Society*, 1885.

de cet Institut, voulut bien nous charger des recherches spéciales qu'il fallait exécuter.

Un matériel d'études fut bientôt à notre disposition, grâce à l'appel qui fut adressé aux apiculteurs dans les journaux spéciaux. Nous avons reçu de nombreux rayons loqueux provenant des régions les plus variées du pays.

Un simple examen microscopique des larves malades nous fit faire connaissance de suite avec les spores décrites par Watson et Cheshire. Il suffisait d'étaler sur porte-objet une parcelle de larve filante, de dessécher, de colorer par la fuchsine ou le violet de méthyle, et de laver ensuite à grande eau, pour retrouver au sein des détritus des spores plus ou moins nombreuses, ovoïdes, souvent accolées parallèlement au nombre de 3, 4, 5, 6 éléments. Cette méthode de coloration rapide teint seulement l'enveloppe de la spore dont le contenu reste incolore. Le plus souvent, on ne voit, comme éléments microbiens, que des spores dans les préparations. Les bacilles décrits comme *bacillus alvei* y sont rares. De plus, on note presque toujours l'absence de ces microbes variés (bacilles, bactéries, micro-coques) qui pullulent dans tous les cadavres.

Cette constatation nous surprit beaucoup, car nous nous attendions à trouver, dans un milieu aussi putride que des larves loqueuses, renfermées dans des rayons malpropres et enlevés des ruches depuis plusieurs jours, toute la série des microbes variés que l'on trouve dans toutes les substances organiques en décomposition.

Il devait certainement y avoir parmi les produits que renferme une larve malade des substances empêchant le développement des microorganismes de la putréfaction. En effet, si on se contente de plonger une anse de platine dans une larve loqueuse et d'ensemencer des tubes de gélatine, de gélose ou de bouillon, on constate que ces milieux restent stériles. Les choses se passent comme si une substance antiseptique avait été ajoutée au milieu de culture, empêchant la germination aussi bien des spores de la loque que des microbes vulgaires.

Cette observation n'avait pas échappé à Watson-Cheyne et Cheshire qui disent que, pour obtenir des cultures, il faut ensemencer des larves malades fraîches, l'exposition à l'air pendant 2 ou 3 jours suffisant, d'après eux, pour tuer les spores.

Or, cela est en contradiction avec les propriétés bien connues des spores microbiennes, qui résistent pendant des années aux agents extérieurs.

Du reste, nous n'avons jamais réussi à obtenir des cultures du microbe, même en ensemençant une anse de platine plongée dans des larves malades très fraîches. Ce n'est qu'en lavant au préalable les produits loqueux dans une grande quantité de bouillon stérile, qu'on réussit à faire proliférer les spores dans les cultures. Sans aucun doute, les larves malades contiennent des substances jouant véritablement le rôle d'antiseptiques vis-à-vis des spores.

Il faut délayer les spores dans un grand excès de liquide indifférent pour annihiler l'action empêchante de ces substances; on a signalé des produits du groupe de l'acide formique dans les ruches d'abeilles, c'est peut-être à ces substances du miel qu'il faut attribuer la difficulté de la culture des spores.

Les bacilles que la germination de ces spores met en liberté dans les milieux de culture sont de grands bâtonnets mobiles, à extrémités arrondies, de 3 à 5 μ de longueur. Ils prennent le Gram. La méthode de coloration des cils de M. Van Ermengem montre des bacilles entourés d'une enveloppe de laquelle partent 10, 12, 15 cils longs et flexueux.

Les spores qui se forment après un certain temps sont bien celles qui ont été décrites par Watson-Cheyne. Les bâtonnets se renflent considérablement là où se forme la spore, et comme les bacilles sont souvent accolés parallèlement, après leur disparition, les spores restent groupées de la même façon.

Le microbe pousse bien sur gélatine et sur tous les milieux usuels des laboratoires. Sur gélatine, en plaques, on voit, après 1 ou 2 jours, des colonies profondes, peu caractéristiques, et des colonies superficielles; celles-ci sont de fines pellicules à bords irréguliers, montrant au microscope des stries ondulées paraissant correspondre à l'existence de plis dans la colonie. Bientôt, cette pellicule se liquéfie à son centre, et la colonie se fond et se désagrège dans le liquide. Le lait stérilisé, ensemencé de ces bacilles, se coagule d'abord, puis une partie du coagulum se redissout. Sur pomme de terre, il se forme une couche grisâtre, festonnée. Le sérum coagulé est rapidement liquéfié.

En poursuivant l'étude des caractères de ce microbe dans les

divers milieux de culture, nous fûmes bientôt frappé des grandes ressemblances que présentait ce *bacillus alvei*, spécifique de la loque, avec un microbe bien connu dans les laboratoires de bactériologie, le *bacillus mesentericus vulgaris;* mêmes caractères microscopiques, mêmes spores, même appareil ciliaire, même développement dans la gélatine. Nous possédions dans la collection de l'Institut de bactériologie un *bacillus mesentericus* type; néanmoins, pour compléter cette étude comparative, nous demandâmes à M. Binot, de l'Institut Pasteur de Paris, des échantillons de ses divers mésentéricus. Nous avons alors procédé à des ensemencements comparés de tous ces divers microbes, et nous avons acquis la certitude absolue que le *bacillus alvei*, considéré par les apiculteurs comme une espèce microbienne spécifique, n'est qu'une variété d'un germe très banal, le *bacillus mesentericus vulgaris*, très répandu dans les milieux extérieurs, notamment sur les végétaux. Sur gélose, sur pomme de terre, sur gélatine en tubes et en plaques, sur bouillon, sur sérum, sur lait, le *bacillus alvei* ne se différencie pas du *bacillus mesentericus*. Que l'on note bien que nous avons opéré non pas avec un seul *bacillus alvei* isolé d'une larve loqueuse, mais avec de nombreux échantillons provenant de ruchers loqueux, envoyés de diverses régions du pays. Toujours les bacillus issus des spores, après lavages de celles-ci, ont montré les caractères du *bacillus mesentericus*. D'ailleurs, la description donnée par Watson-Cheyne et Cheshire est bien celle d'un *bacillus mesentericus;* à l'époque où le travail de ces observateurs a paru (1885), on connaissait mal le *bacillus mesentericus*, il n'est pas étonnant que l'on ait pris pour un germe tout particulier et spécifique un microbe en réalité fort banal.

L'identité est particulièrement remarquable dans des milieux tels que le lait et la mie de pain. Sur lait, en tubes, le *bacillus alvei* et le *bacillus mesentericus* vulgaire produisent d'abord la coagulation de la caséine ; puis celle-ci est de nouveau liquéfiée en partie. Le liquide se sépare alors en trois couches : une couche supérieure formée d'une sorte de crème visqueuse et filante, remplie de bacilles ; une couche moyenne plus claire, non visqueuse ; une couche inferieure formée de caséine non dissoute. L'odeur est fade, urineuse. Sur de la mie de pain mouillée et stérilisée, en flacons d'Erlenmeyer, les deux microbes poussent

très bien et, particularité curieuse, le pain devient filant, tout comme les larves loqueuses.

Mais la similitude des deux microbes apparaît encore bien mieux quand on fait l'étude de leurs anti-corps.

On sait que l'un des meilleurs critériums que l'on possède actuellement en bactériologie pour l'identification des espèces microbiennes est leur sensibilité aux sérums dits spécifiques, renfermant deux sortes de substances n'agissant bien que sur le microbe en jeu, les agglutinines et les sensibilisatrices. Pour élucider définitivement la question de l'identité ou de la non-identité du bacille de la loque et du *bacillus mesentericus*, identité déjà très vraisemblable d'après la comparaison de leurs caractères de morphologie et de culture, nous avons injecté à une série de cobayes des émulsions de ces deux microbes. Ces émulsions étaient obtenues en broyant, dans la même quantité d'eau salée physiologique, les dépôts de la culture sur gélose des deux bacilles. Après quatre injections, espacées de huit en huit jours, on recueille le sérum de ces animaux.

Tandis que le sérum normal de cobaye se montre dépourvu de propriétés agglutinantes sur le *bacillus alvei* et sur le *bacillus mesentericus*, le sérum des cobayes traités par le *bacillus alvei* agglutinait les émulsions de ce dernier jusqu'au titre de 1 p. 300 et le *bacillus mesentericus* au titre de 1 p. 250. Inversement, le sérum des cobayes injectés de *bacillus mesentericus* agglutinait le *mesentericus* aussi bien que l'*alvei* au titre de 1 p. 250. Les microbes autres que ces deux bacilles ne subissaient aucune agglutination à ces dilutions des sérums.

On obtient des résultats identiques en recherchant les sensibilisatrices spécifiques par la méthode de Bordet-Gengou[1].

Il est inutile de transcrire ici les détails assez compliqués de cette recherche, bien connue des bactériologistes. Qu'il nous suffise de dire que le sérum d'un animal traité par le *bacillus alvei* a la propriété de sensibiliser, c'est-à-dire de rendre ce microbe apte à fixer l'alexine des sérums normaux, aussi bien le *bacillus alvei* que le *bacillus mesentericus* et réciproquement, et cette propriété n'existe que vis-à-vis de ces deux microbes.

Il n'est pas un bactériologiste qui, mis en présence des

1. Bordet et Gengou, Substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens, *Annales Pasteur*, mai 1901.

résultats de cette étude comparative, n'acquière la conviction que le bacille de Watson-Cheyne et Cheshire n'est autre que le *bacillus mesentericus vulgaris*.

* * *

Cette question de l'identité du microbe étant résolue, comment faut-il se représenter la pathogénie de la loque? Il n'est pas douteux que l'affection ne soit due au *bacillus mesentericus*: on ne trouve, en effet, que ce microbe au sein des larves malades ; celles-ci sont visqueuses, filantes, tout comme certains milieux de culture (pain mouillé notamment) ensemencés de *bacillus mesentericus* ou de *bacillus alvei*. La maladie des abeilles serait donc due, non pas à un microbe tout particulier dont l'apparition ne s'observe qu'au cours des épidémies de loque — les choses se passent ainsi dans l'espèce humaine pour la peste, le choléra, etc. — mais à la pullulation intempestive au sein des larves d'un germe fort vulgaire, très répandu dans les milieux extérieurs et acquérant à un moment donné, pour l'une ou l'autre cause, les qualités d'un microbe pathogène. Des faits de ce genre sont excessivement fréquents en pathologie humaine. Nos muqueuses normales sont le réceptacle de microbes banaux, habituellement inoffensifs — tels que les streptocoques, les staphylocoques, le *bacterium coli*, etc. — qui, dans certains cas, sans que l'on puisse toujours déterminer les conditions de cette exaltation de virulence, deviennent pathogènes et provoquent des troubles graves de la santé. La virulence de ces microparasites peut même devenir telle, que ces germes, éliminés par le malade, deviennent très dangereux pour les sujets sains et, sans qu'il y ait prédisposition apparente chez ces derniers, sont capables d'y provoquer de nouveau une maladie infectieuse et contagieuse.

Il faut bien admettre que le *bacillus mesentericus* joue vis à vis des larves d'abeilles le même rôle que les streptocoques, *bacterium coli* et autres microparasites de l'homme normal. En fait, nous avons retrouvé le *bacillus alvei* chez des abeilles et des larves saines ; seulement le nombre des germes y est infiniment moins considérable que dans une larve loqueuse. Lorsque l'on fait des cultures d'abeilles et de larves non malades, on n'observe jamais le développement de microbes appartenant aux espèces habituelles des muqueuses des animaux supérieurs à

l'état de santé (*bacterium coli*, streptocoque, etc.) Mais on obtient du *bacillus mesentericus* et du *bacillus subtilis*, espèces à spores très résistantes et très répandues dans les milieux extérieurs, notamment à la surface des végétaux.

Pourquoi, à un moment donné, dans une ruche pleine de larves, le *bacillus mesentericus* se met-il à attaquer ces dernières, à proliférer dans les tissus et à provoquer toutes ces altérations qui constituent la loque ? Il faut bien admettre que les larves ont dû se trouver dans des conditions anormales, qui ont modifié profondément la résistance physiologique de leurs tissus aux microbes présents habituellement autour d'elles et dans leur tube digestif. Le *bacillus mesentericus* est d'ailleurs coutumier de ces méfaits. C'est lui qui provoque cette maladie si curieuse du pain filant : dans certaines conditions mal connues encore de fermentation anormale du pain, ou de mauvaise conservation de ce dernier, on voit la pâte prendre un aspect filant tout particulier.

Le professeur Laurent, de Gembloux, a étudié autrefois cette maladie du pain et il a décrit comme agent causal un bacille qu'il a dénommé : bactérie de la fermentation panaire . La question a été reprise par d'autres et l'on sait aujourd'hui que ce microbe n'est autre que le *bacillus mesentericus* . Vincent, dans un remarquable travail, a montré que l'on pouvait, par une éducation progressive, transformer des microbes saprophytes, notamment le *bacillus mesentericus*, en microbes pathogènes, et créer artificiellement, avec leur aide, des maladies expérimentales analogues à celles que provoquent les agents infectieux usuels [2].

Le fait que ces microbes vulgaires, très répandus dans les milieux extérieurs, peuvent devenir les agents de maladies graves, a été établi pour la première fois par Pasteur, précisément dans sa magistrale étude des maladies des vers à soie, qui présentent tant de rapports avec l'affection que nous étudions. Pasteur avait parfaitement noté que les vers à soie peuvent devenir malades, non seulement à la suite de l'attaque des corpuscules, germes très spécifiques, mais aussi quand, mal nourris, mal entretenus, leurs tissus n'opposent plus de résis-

1. *Bulletin de l'Académie Royale de Belgique*, 3e série, t. X, 1885.

2. VINCENT, Sur les aptitudes pathogènes des microbes saprophytes. *Annales Pasteur* 1898, n° 12.

tance suffisante à l'invasion des bacilles vulgaires de leur tube digestif. C'est alors la maladie de la flacherie, toute différente de celle due aux corpuscules. La flacherie n'a plus guère été étudiée depuis Pasteur : nous croyons que si cette étude était reprise, à la lumière des connaissances actuelles, l'on découvrirait peut-être que, tout au moins l'une des formes de cette flacherie est due à des microbes de la famille du mésentéricus.

Bien qu'il soit difficile de réaliser expérimentalement les conditions naturelles d'une infection, nous avons tenté des essais de production artificielle de la loque dans une ruche au moyen du *bacillus mesentericus* et du *bacillus alvei*.

Nous avons réussi à conduire à bonne fin l'éducation d'une ruche à l'Institut même, aidé en cela par les conseils d'apiculteurs éclairés de la Société du Bassin de la Meuse. (MM. Pirotte, Stroven et Sior.)

Quand nous avons été en possession de larves bien vivantes, dans notre ruche en pleine prospérité, nous en avons tué quelques-unes par simples piqûres, et nous avons répandu autour d'elles, dans leurs cellules, quelques gouttes d'émulsion de culture sur gélose de *bacillus mesentericus*. Le gâteau ainsi ensemencé a été remis en place dans la ruche. Après trois jours, les abeilles avaient déjà complètement nettoyé les loges des larves tuées, où il ne restait plus traces ni de larve ni de culture. Des tentatives répétées pour produire l'altération loqueuse de cette façon ont toujours échoué.

Mais si au lieu de cultiver le *bacillus mesentericus* sur gélose nutritive ordinaire, on le fait se multiplier sur un milieu tout spécial, préparé avec des larves d'abeilles elles-mêmes, on obtient des résultats tout différents. Après avoir recueilli une grande quantité de larves, on les broie, on les triture et on compose avec elles un bouillon nutritif, suivant la formule habituelle des laboratoires. Le mésentericus pousse abondamment dans ce bouillon et également dans la gélose, la gélatine préparées avec ce bouillon de larves. Après une série d'ensemencements successifs, on obtient une race spéciale de *bacillus mesentericus*. A l'aide de cultures de celle-ci, on recommence des essais de production de la loque dans une ruche saine.

Au premier essai, fait dans des conditions identiques à celles qui avaient été réalisées antérieurement, on constate,

après quatre jours, que plusieurs des loges ensemencées ne sont pas nettoyées. Leur contenu est grisâtre et *filant*, absolument comme le contenu de cellules loqueuses. Les loges operculées présentent une petite déchirure de l'opercule, encore une fois comme dans la loque. La seule différence entre nos couvains rendus loqueux et un couvain provenant d'une ruche atteinte de la loque naturelle, est que le nombre des larves malades est moindre dans nos conditions artificielles. La cinquième partie environ des larves ensemencées au moyen du *bacillus mesentericus* exalté est devenue loqueuse; les autres cellules ont été débarrassées et nettoyées de leur contenu par les abeilles.

Au microscope, on constate la présence, dans le contenu filant des cellules, d'un bacille en tout semblable au *bacillus alvei* de Watson-Cheyne. Quelques jours après, ce contenu est surtout riche en spores caractéristiques pour la plupart du *bacillus alvei* et du *bacillus mesentericus*.

Cette expérience positive a été réalisée au déclin de l'été, à un moment où la vie dans la ruche était considérablement ralentie et où la reine-mère ne pondait presque plus.

Nos résultats relativement heureux d'inoculation doivent être attribués d'une part à la modification subie par le *bacillus mesentericus* cultivé en bouillon de larves d'abeilles, et d'autre part à ce que les essais de production de la loque ont été tentés à un moment de l'année où l'activité de la ruche avait beaucoup diminué. Cette seconde circonstance est probablement la plus importante : en effet, une ruche se trouvant dans d'excellentes conditions, au début de l'année, en pleine prospérité, ensemencée à diverses reprises, tantôt avec le *bacillus alvei*, tantôt avec le *bacillus mesentericus* provenant d'une culture en bouillon de larves, ne s'est jamais laissée envahir par la loque.

CONCLUSIONS[1].

1. — Le *bacillus alvei*, décrit par Watson-Cheyne et Cheshire comme l'agent spécifique de la maladie loqueuse des abeilles, n'est autre qu'une variété d'un microbe banal, très répandu dans la nature, le *bacillus mesentericus vulgaris*.

2. — Le *bacillus mesentericus* peut se rencontrer dans les

1. Les principales conclusions de ce mémoire ont été présentées en 1900, au Congrès des Apiculteurs de Dinant. (Belgique.)

ruches saines, aussi bien dans les cellules des gâteaux que dans le contenu intestinal des abeilles.

3. Le *bacillus mesentericus* produit par sa pullulation dans les tissus des larves les altérations caractéristiques de la loque.

Ces données, basées sur les constatations expérimentales, doivent être prises en considération par les apiculteurs.

Certes, on ne peut exclure, *a priori*, quand la loque apparaît dans une ruche, l'arrivée du bacille par le dehors, soit par les abeilles butineuses souillées au contact d'abeilles d'une ruche loqueuse, soit par la cire ayant servi à la préparation des rayons artificiels et renfermant des spores provenant d'une ruche malade.

Mais l'apiculteur ne doit pas toujours chercher au dehors les causes de la maladie de ses ouvrières, et accuser le voisin des désastres qu'il observe dans son rucher. Comme la flacherie des vers à soie, la loque doit résulter souvent de mauvaises conditions, mal déterminées encore, il est vrai, mais dont la réalité n'est pas douteuse, de nutrition et d'hygiène de la ruche et de ses habitants.

C'est donc avant tout (et ce n'est pas seulement aux maladies des abeilles que s'applique cette vérité), l'hygiène, dans toutes ses exigences, qui doit être la préoccupation de l'apiculteur.

Certes, en cas de loque, celui-ci doit neutraliser radicalement le foyer d'infection : la grande résistance bien connue des spores du *bacillus mesentericus* aux agents chimiques — tels que la formaline, le sublimé, l'acide phénique et les désinfectants usuels en général — doit faire rejeter toutes ces substances comme n'ayant que des effets illusoires et faire adopter la seule pratique efficace, la destruction par le feu des ruches atteintes.

Mais la loque ne disparaîtra pas d'un rucher, eût-on détruit toutes les spores des larves malades, si l'on ne veille pas à la rigoureuse observation des lois de l'hygiène apicole : le *bacillus mesentericus* est tellement répandu dans la nature qu'il envahira de nouveau les larves si les délicats habitants de la ruche ne sont pas placés dans les conditions normales indispensables à leur développement.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

16me ANNÉE 25 OCTOBRE 1902 N° 10

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LE SORT DES BACILLES DE LA LÈPRE

DANS L'ORGANISME DES ANIMAUX (COBAYES)

Par le Dr W.-W. IWANOW (DE SAINT-PÉTERSBOURG)

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff, avec les Pl. XI et XII.)

C'est en 1873 que Hansen a découvert la présence, dans les lépromes, d'un bacille spécifique. En 1881, Neisser a démontré que, par ses caractères morphologiques, ce bacille appartient à la catégorie de ceux qui ne se décolorent pas par les acides. Depuis, le bacille de Hansen-Neisser a été constaté dans les tissus frappés par le processus lépreux, avec une constance et en quantité telles qu'il est désormais impossible de mettre en doute la nature infectieuse de la lèpre. Et pourtant les conditions et le mode de pénétration de ce bacille dans l'organisme humain demeurent inconnus, et l'on continue même à discuter sur la possiblilité de la transmission directe de la lèpre d'homme à homme. Ce qui rend actuellement la solution du problème difficilement abordable, c'est l'impossibilité de recourir à la démonstration expérimentale. En effet, tous les efforts pour cultiver le bacille de la lèpre sur des milieux artificiels sont restés jusqu'à présent vains, ou bien n'ont abouti qu'à des résultats peu probants.

Il en est de même des tentatives d'inoculation de la lèpre aux animaux. Les expériences ont été surtout faites sur des lapins et des cobayes; un certain nombre d'inoculations ont été pratiquées sur des chats, des chiens et sur diverses espèces de singes. On

a également cherché à inoculer la lèpre aux porcs, à des oiseaux (poules, pigeons, perroquets), à des poissons de mer et d'eau douce, aux souris domestiques; il faut enfin signaler quelques essais d'inoculation aux chèvres, ânes, souris blanches, rats blancs et grenouilles.

Le mode d'inoculation auquel on recourt le plus volontiers est la transplantation de lépromes excisés, dans la chambre antérieure de l'œil, dans la cavité péritonéale, sous la peau, sous la dure-mère céphalo-rachidienne.

Dans un nombre de cas relativement restreint, on s'est servi d'émulsions préparées avec des lépromes excisés, ou bien de sang obtenu par scarification des lépromes cutanés. Les inoculations ont été pratiquées aussi dans les muscles, le sang, la peau et la pituitaire. On a également employé le pus d'ulcères lépreux, le dépôt urinaire des sujets atteints de lèpre, ainsi que divers organes provenant de cadavres des lépreux.

La plupart des auteurs, avec Hansen, Neisser, Köbner, arrivent à la conclusion que jusqu'à présent on n'a pas encore réussi à inoculer la lèpre aux animaux. Quelques-uns, cependant, croient avoir provoqué chez les animaux inoculés la production de lépromes locaux, mais sans généralisation du processus morbide. Ainsi, Neisser, dans ses premières expériences, était tenté de croire à la possibilité de provoquer chez le chien un léprome au point inoculé; mais de nouvelles et nombreuses expériences lui montrèrent qu'il n'en était rien. Sans nous y arrêter, nous allons résumer en quelques mots les essais de Damsch et de Vossius.

La plupart des nombreuses expériences de Damsch ont donné des résultats négatifs, mais il considère les quatre suivantes comme démontrant la possibilité d'inoculer la lèpre aux animaux.

On transplante des fragments de lépromes dans la chambre antérieure de l'œil sur deux lapins. Au bout de 3 à 5 semaines, il se développe chez tous les deux une opacité, en stries, de la cornée, qui ne cesse de progresser jusqu'à la mort et qui s'est installée sans être précédée de phénomènes inflammatoires. Au 4e mois, on constate chez l'un des lapins, une femelle, des troubles cérébraux, sous forme d'hémi-contracture gauche des muscles de la nuque, des mouvements fréquents de

rotation du corps autour de l'axe longitudinal, du strabisme et du nystagmus de l'œil inoculé; 139 jours après l'inoculation, l'animal succombe à une péritonite suppurée post-puerpérale. Chez le deuxième lapin, des phénomènes cérébraux analogues se montrent au 6e mois, et la mort survient le 219e jour après l'inoculation, avec amaigrissement excessif et convulsions toniques et cloniques du côté gauche de la face et des membres droits. A l'autopsie on trouve, à l'examen des yeux inoculés, une opacité en stries et une vascularisation de la cornée, au niveau du fragment transplanté, avec, tout autour, de petits nodules jaunâtres faisant saillie dans la chambre antérieure. Ces nodules, par leur confluence, occupaient la plus grande partie de la moitié inférieure de la chambre antérieure de l'œil. Sur la membrane de Descemet et la cristalloïde antérieure, il y avait des dépôts blanc jaunâtre, sous forme de points ou de stries. L'iris est très injecté et tuméfié.

L'examen microscopique démontra que l'iris et le corps ciliaire sont infiltrés de grosses cellules contenant des bacilles lépreux et disposées en bandes. Les dépôts se composent de cellules rondes contenant un plus ou moins grand nombre de bacilles. Le tissu de nouvelle formation développé autour du fragment implanté est formé par du tissu granuleux composé de cellules épithélioïdes, rondes et fusiformes, avec, dans leur intervalle, une petite quantité de cellules contenant des bacilles. Tous ces produits sont tellement riches en bacilles, qu'on est obligé d'admettre une multiplication des bactéries inoculées, d'autant plus que la tumeur transplantée reste elle-même toujours très riche en bacilles. Ces derniers semblent partout normaux; beaucoup d'entre eux présentent une apparence de sporulation, sous forme de quelques vacuoles non colorées. Dans les autres membranes de l'œil, on n'a pas trouvé de cellules contenant des bacilles. La pie-mère présente une infiltration microcellulaire, mais sans bacilles. Par contre, chez le 2e lapin on trouve dans la substance protubérancielle des groupes de 6 à 12 bacilles, qui semblent librement disposés dans les fentes lymphatiques, sans altérations secondaires autour d'eux. Dans les autres organes, rien ne parle en faveur de généralisation de l'infection.

Dans une autre expérience, un fragment de léprome fut

transplanté sous la peau d'un chat. L'examen, pratiqué au bout de 120 jours, démontre que ce fragment est ratatiné, et entouré de tissu de granulation néoformé, se distinguant du tissu de granulation ordinaire par sa richesse en grosses cellules, remplies de bacilles lépreux fortement colorés. Un petit nombre de bacilles se trouve aussi en dehors des cellules. Dans le fragment transplanté, les bacilles conservent également leur propriété de se colorer. Au delà des limites du tissu de granulation on trouve, dans l'adventice des vaisseaux sous-cutanés, des séries de petites cellules englobant des bacilles. A un autre chat, la transplantation est pratiquée dans la cavité péritonéale et l'animal est sacrifié au bout de 120 jours. On constate alors que le fragment transplanté, ratatiné et calcifié, adhère au tissu graisseux de l'épiploon et est entouré d'une gaine de tissu de granulation. Ce tissu présente en général les mêmes caractères que chez le premier chat inoculé, mais le tissu transplanté est très pauvre en bactéries.

Vossius insère également des fragments de lépromes dans la chambre antérieure de lapins. Les lésions locales de l'œil correspondent par leurs caractères et leurs traits généraux à ceux observés par Damsch. Vossius les considère, lui aussi, comme étant celles d'un lépróme local.

Les résultats obtenus par ces deux auteurs ont été confirmés par d'autres expérimentateurs (Campana, Leloir, Wesener, et d'autres). Toutefois ces derniers auteurs ont donné une tout autre interprétation aux lésions histologiques constatées au point d'inoculation et dans son voisinage. D'après eux, l'inoculation d'un fragment de léprome provoque une réaction inflammatoire dans son voisinage immédiat ; le fragment lui-même subit une dégénérescence granuleuse, en même temps que se produit l'infiltration des leucocytes destinés à englober les bacilles et le tissu désagrégé. La présence des bacilles de la lèpre, même en quantité notable, dans le tissu inflammé circumvoisin, est due, non à la multiplication de ces bacilles, mais à leur transport du fragment désagrégé du léprome transplanté.

Les trois auteurs que nous venons de citer démontrent la justesse de leur interprétation de la façon suivante : ils inoculent du tissu lépreux conservé pendant deux à trois ans et demi dans de l'alcool absolu ; or, l'inoculation de bacilles lépreux cer-

tainement morts s'accompagne de lésions histologiques identiques à celles que provoque l'inoculation de tissu lépreux frais.

Examinons maintenant les expériences des quelques auteurs qui croient avoir réussi à provoquer chez les animaux une infection lépreuse générale.

En 1885, Melcher et Orthmann introduisirent dans la chambre antérieure de l'œil d'un lapin un fragment de léprome fraîchement excisé. L'animal succomba au bout de 300 jours. Les expérimentateurs constatèrent, en outre des lésions locales de l'œil, des lésions de la plèvre et des régions superficielles des poumons. Ces lésions consistaient en une éruption de nombreux nodules blanc jaunâtre, du volume d'une tête d'épingle. De plus, le feuillet pariétal du péricarde présentait des épaississements durs et nombreux du volume d'une lentille.

L'année suivante, les mêmes auteurs ont rapporté les résultats de nouvelles expériences sur deux lapins auxquels ils avaient pratiqué des inoculations analogues. Les animaux succombèrent au bout de 4 mois, et à l'autopsie on trouva presque tous les viscères parsemés de nodules.

Les auteurs attirent plus spécialement l'attention sur les lésions de la muqueuse intestinale et des ganglions mésentériques. Se basant sur l'examen microscopique des lésions constatées chez les 3 lapins en expérience, Melcher et Orthmann croient qu'ils avaient affaire à une infection lépreuse générale.

Nous ne nous arrêterons pas à la description des lésions histologiques constatées par ces auteurs; disons seulement qu'il est très difficile de les différencier d'avec celles dues à la tuberculose. Hansen, qui a vu les préparations de Melcher et Orthmann, ne considère pas les lésions comme étant de nature lépreuse. Et en effet, les preuves invoquées par les auteurs en faveur de la nature lépreuse des lésions en question (manière dont les bactéries se comportent vis-à-vis des matières colorantes, leur disposition intra-cellulaire, etc.) ne peuvent pas être considérées comme démonstratives, surtout étant donné qu'on n'a pas fait d'expériences de contrôle, ayant pour but d'exclure l'hypothèse de la tuberculose. Le grand nombre d'inoculations faites à des lapins au cours des seize années qui suivirent l'expérience de Melcher et Orthmann n'ont pas donné de résultats positifs. Cependant, récemment, Barannikow, qui, depuis ces trois

dernières années, s'occupe de culture des bacilles de Hansen et a obtenu des résultats encourageants, a communiqué les résultats positifs auxquels il est arrivé en inoculant la lèpre par transplantation de fragments lépreux dans la chambre antérieure de l'œil d'un lapin. Macroscopiquement, les lésions provoquées ressemblent à celles observées par Melcher et Orthmann; l'examen microscopique n'est pas encore terminé; quant au diagnostic différentiel avec la tuberculose, aucune expérience n'a été faite pour l'établir.

Il faut cependant signaler ce fait qu'un certain nombre des animaux, et notamment des lapins, auxquels on avait inoculé des produits lépreux, succombent avec des lésions qui rappellent macroscopiquement et au microscope la tuberculose généralisée. En plus des expériences que nous venons de citer, on peut encore signaler celles de Wesener qui, chez 2 des 8 lapins inoculés par lui, a observé les mêmes lésions.

Les expériences de Vnoukof méritent particulièrement d'attirer l'attention; sur 20 lapins auxquels il avait inoculé des tubercules lépreux récemment excisés (sous la peau, dans la cavité abdominale, dans la chambre antérieure), cet auteur a constaté chez 14 de ces animaux la tuberculose des organes internes. Malheureusement, le diagnostic n'a été établi, comme dans les cas des auteurs précédents, que sur l'examen histologique, et dans un seul cas on a pratiqué des ensemencements sur des milieux appropriés, lesquels ont donné des résultats positifs.

C'est un fait qui mérite toute notre attention et qui montre combien il est nécessaire dans des cas semblables de faire des expériences de contrôle.

La communication préliminaire faite par Tedeschi en 1893 occupe une place à part et n'a pas été confirmée depuis. Cet auteur a transplanté un léprome cutané, récemment enlevé, sous la dure-mère rachidienne d'un singe. L'animal succomba au bout de 8 jours, avec des phénomènes de paralysie du train postérieur. A l'autopsie on constata que la moelle était, sur une étendue assez considérable, comme engainée d'une substance jaune rougeâtre, de consistance molle, et entourée d'un liquide blanchâtre, trouble. Cette gaine était formée par du tissu jaune, et contenant un certain nombre de cellules rondes et épithélioïdes,

ainsi que d'une quantité énorme de bacilles lépreux. Les liquides des ventricules centraux de l'espace sous-arachnoïdien et du canal rachidien étaient également très riches en bacilles. En outre, l'auteur constata des lésions d'hépatite parenchymateuse et de tuméfaction aiguë de la rate; cette dernière contenait des bacilles présentant les mêmes propriétés que ceux de l'exsudat méningé. Les ensemencements sur gélose glycérinée et sur sérum ont donné des résultats négatifs. L'auteur considère les lésions morbides qu'il a provoquées comme dues à l'action des bactéries lépreuses.

Tels sont les résultats des tentatives faites jusqu'à présent dans le but d'inoculer la lèpre aux animaux. Il serait prématuré d'en conclure que les animaux possèdent une immunité naturelle absolue vis-à-vis de la lèpre. La résistance de certains d'entre eux est néanmoins très grande.

Pour l'étudier, il est nécessaire de savoir ce que deviennent les bacilles lépreux dans un organisme animal.

Les données obtenues à ce sujet jusqu'à présent ne permettent que la conclusion générale suivante : l'introduction dans l'organisme de produits lépreux s'accompagne d'inflammation réactionnelle; il se produit un afflux de leucocytes, lesquels englobent les bacilles lépreux et les transportent dans la région la plus voisine du point inoculé, d'où production de tissu d'inflammation néoformé. Après un laps de temps plus ou moins long, les produits inoculés disparaissent complètement, et il n'en reste plus aucune trace dans l'organisme.

D'ailleurs les expériences de Campana semblent démontrer qu'après injection d'une émulsion de produits lépreux, on peut trouver les bacilles dans des régions éloignées du lieu d'inoculation. Cet auteur a injecté sous la peau et dans la cavité péritonéale des cobayes l'émulsion d'un lépromе ayant séjourné 2 à 3 ans dans de l'alcool; vingt-quatre heures après, il a provoqué, à l'aide d'une ligature, de l'œdème des membres postérieurs et a examiné la sérosité qui les infiltrait ; on y trouvait toujours des bacilles lépreux, libres ou inclus dans des leucocytes.

Le laps de temps au bout duquel les bacilles disparaissent de l'économie, lorsque des fragments de lépromes récemment excisés ont été transplantés sous la peau, dans le péritoine ou dans la chambre antérieure, est de plusieurs mois. Ainsi, dans

les expériences de Wolters, qui a introduit sous la peau de deux cobayes des fragments de lépromes frais, on ne trouva plus trace des produits inoculés, au bout de 4 mois. D'autre part, Leloir, qui a pratiqué des inoculations dans le péritoine de 3 cobayes, en a encore trouvé des traces, entourées de tissu néoformé, 2 ans 1/2 après l'inoculation. L'examen microscopique a démontré que ces restes avaient subi la dégénérescence caséeuse et contenaient très manifestement des bacilles lépreux dont la plupart étaient fragmentés ; le tissu de nouvelle formation qui les entourait ne contenait point de bacilles.

Signalons encore la courte communication de Luca. Cet auteur avait injecté dans le péritoine des lapins une émulsion de lépromes cutanés, et a trouvé que déjà, au bout de quelques heures, les bacilles lépreux étaient englobés par les phagocytes. Au bout de 24 heures, pas un des bacilles englobés n'était intact : tous étaient fragmentés, et cette fragmentation continuait jusqu'à leur complète disparition, ce qui avait lieu vers le 12e jour.

Tels sont les faits qui résument nos connaissances actuelles sur le sort des bacilles lépreux introduits dans l'organisme animal. Comme on voit, la question ne peut pas être considérée comme définitivement épuisée. Aussi avons-nous entrepris des recherches à ce sujet.



Nos expériences ont porté exclusivement sur des cobayes ; nous nous sommes servi à cet effet de lépromes cutanés, excisés à plusieurs reprises, chez le même malade qui s'est volontairement et consciemment prêté à cette opération. C'est seulement pour la première expérience que nous avons employé un nodule lépreux provenant d'un autre malade[1]. L'excision n'était point douloureuse, on la pratiquait sans anesthésie. Chaque fois on excisait un seul nodule, du volume d'un petit pois à celui d'une cerise, une ou 2 heures après l'excision, on triturait les fragments excisés dans un mortier en porcelaine, avec une solution physiologique de sel marin, pour les transformer en une émulsion aussi fine que possible. Durant toutes

1. Les deux malades se trouvaient à l'hôpital Saint-Louis, dans le service de M. le docteur Hallopeau, auquel nous exprimons ici, ainsi qu'à son interne, M. Fouquet, nos plus vifs remerciements.

ces manipulations, on observait rigoureusement les règles de l'asepsie.

L'émulsion ainsi préparée était injectée à plusieurs cobayes ; celle du premier nodule, lequel contenait une quantité colossale de bactéries, n'a été injectée qu'à 2 cobayes. Nous étions convaincu que le but que nous poursuivons ne demande pas l'introduction d'une telle quantité de bactéries ; nous avons, dans nos expériences ultérieures, réparti l'émulsion sur un plus grand nombre d'animaux, en tâchant de donner à chacun d'eux à peu près la même quantité de bactéries; ainsi, dans chaque série d'expériences, la quantité et la concentration de l'émulsion étaient-elles différentes. Du reste, chez quelques cobayes, on a introduit intentionnellement une quantité notablement moindre d'émulsion.

Injection de bacilles lépreux dans la cavité péritonéale. — Voyons d'abord ce qui se passe après injection de l'émulsion dans la cavité péritonéale.

Dans l'exsudat fluide, contenant une quantité relativement peu considérable de polynucléaires et encore moins de mononucléaires, on trouvait, une heure après l'injection, à côté d'un grand nombre de bactéries libres, une certaine quantité d'autres, déjà phagocytées par ces deux variétés de cellules. Durant les heures suivantes, l'exsudat devenait peu à peu plus riche en éléments figurés, et au bout de 6 heures il se composait principalement de cellules polynucléaires.

Un nombre assez considérable de ces leucocytes, ainsi que des mononucléaires, englobaient les bâtonnets de la lèpre; toutefois le plus grand nombre de ces derniers se trouvaient encore à l'état libre.

Plus tard, l'exsudat s'épaississait de plus en plus; le nombre de mononucléaires augmentait graduellement, en même temps que celui des bactéries libres diminuait, de sorte qu'au bout de 20 heures, l'exsudat prenait généralement la consistance visqueuse du pus. Les polynucléaires et les mononucléaires sont, à ce moment, à peu près en nombre égal, la presque totalité des bactéries est phagocytée surtout par les mononucléaires. Il va sans dire qu'à côté des bacilles de la lèpre l'exsudat contenait en même temps quelques débris de tissus, tels que fragments de noyaux, petits lambeaux de tissu conjonctif

et de tissu élastique, cellules épidermiques, gouttelettes de graisse, etc. Tous ces débris deviennent surtout nets vers la 20e heure, étant en ce moment pour la plupart inclus dans des mononucléaires. Les modifications ultérieures de l'exsudat consistaient en la diminution marquée des polynucléaires, le nombre des mononucléaires continuant toujours à augmenter, et vers la 48e heure l'exsudat, tout en restant épais, se composait en grande partie de cette variété de leucocytes. Les bactéries lépreuses étaient toujours aussi nombreuses, mais ce n'est qu'exceptionnellement qu'on en voyait de libres. La phagocytose était presque exclusivement l'œuvre des mononucléaires, et il n'était pas rare de voir un polynucléaire contenant souvent une ou plusieurs bactéries, être englobé par un mononucléaire. Puis l'exsudat commençait peu à peu à devenir liquide, mais tout en conservant cependant ses autres caractères. Les bactéries non englobées ne se rencontrent plus qu'à titre tout à fait exceptionnel; on pouvait alors presque toujours constater qu'elles se trouvaient au voisinage d'un lambeau plus ou moins volumineux de tissu, et étaient entourés, ainsi que ces lambeaux, d'un groupe de mononucléaires.

Vers le 5e ou 6e jour, l'exsudat était plus fluide, mais cependant nettement trouble; parmi les éléments morphologiques prédominaient les mononucléaires, qui ont englobé les nombreux bacilles lépreux.

La liquéfaction de l'exsudat continue les jours suivants, et l'aspect microscopique est à peu près le même. Cependant, au fur et à mesure que l'exsudat se liquéfie, les bactéries diminuent graduellement en nombre. On en trouvait encore facilement, dans des mononucléaires, même 2 ou 3 semaines après l'injection. Au cours du 2e mois, ainsi que plus tard, l'exsudat ne différait essentiellement d'un exsudat normal que par sa plus grande teneur en éléments figurés, parmi lesquels prédominent les mononucléaires; les lymphocytes sont généralement très peu nombreux; les polynucléaires n'apparaissent en plus grand nombre que par moments, et la plupart d'entre eux sont des pseudo-éosinophiles.

Au second mois, et même plutôt, chez quelques cobayes, les bactéries deviennent peu nombreuses dans l'exsudat : dans une goutte on peut compter 10 à 20 mononucléaires contenant des

bacilles. Plus tard, leur nombre est encore plus faible; toutefois on rencontre facilement des préparations contenant 1 à 5 mononucléaires englobant des bactéries. Le laps de temps le plus court au bout duquel nous ne trouvions plus de bactéries dans l'exsudat a été de 4 semaines, chez un cobaye. Notons ici que ce cobaye (nº 45) a succombé à la tuberculose, ainsi que nous avons pu nous en convaincre. Chez un autre cobaye (nº 98) les bactéries semblaient avoir disparu à la 8e semaine; d'autre part, chez le cobaye nº 50, elles ont persisté durant 5 mois, et chez le cobaye nº 90 on a trouvé des bactéries pendant les 8 mois qu'a duré l'expérience.

Parmi les cobayes auxquels on avait injecté intentionnellement des doses plusieurs fois moindres, il en est un (nº 28) chez lequel les bactéries avaient disparu de l'exsudat au bout d'un mois[1]. Chez les autres, on les a trouvés pour la dernière fois après 3 mois. Le cobaye nº 60, qui avait reçu dans la cavité péritonéale une demi-culture sur gélose de *proteus vulgaris*, et 2 heures après une dose ordinaire d'émulsion lépreuse, fournissait après 5 semaines un exsudat où on ne voyait plus de bacilles lépreux.

Lorsque l'on suit la diminution progressive des bactéries dans l'exsudat, il est difficile de l'attribuer exclusivement à la digestion des bactéries par les macrophages de l'exsudat. On remarque bien, il est vrai, dès les premiers jours, un nombre relativement assez considérable de bactéries qui semblent altérées. Mais il ne faut pas perdre de vue que dans l'émulsion qui servait aux injections, les mêmes formes ne faisaient point défaut. Bien au contraire, tant qu'il est possible de constater les bacilles dans l'exsudat, la plupart apparaissent avec leur aspect normal et leur réaction tinctoriale habituelle.

Cependant, à des périodes plus éloignées, la proportion des bacilles *altérés* augmentait un peu. On trouvait, en outre, à ce moment, des bacilles à contours irréguliers, présentant une teinte rouge, pas brillante, mais mate, et aussi des bacilles fragmentés en des grains de dimensions diverses.

Ces faits semblent démontrer qu'une certaine quantité de bacilles se laissent tout de même attaquer par les agents digestifs des leucocytes.

1. Le cobaye fut sacrifié au bout de 15 semaines; on a trouvé dans l'exsudat un mononucléaire contenant une bactérie parfaitement conservée.

Voyons maintenant ce qu'on peut constater lorsque l'on sacrifie les animaux à des intervalles déterminés.

Après 48 heures, on ne constatait qu'un certain degré d'injection des vaisseaux du péritoine et d'hyperémie des organes abdominaux, et une petite quantité d'exsudat épais, visqueux.

Sur la séreuse étaient semés des amas blanchâtres, à peu près du volume d'une tête d'épingle; ils se détachaient facilement; leur consistance était molle, visqueuse, et ils se laissaient facilement écraser entre deux lamelles. La coloration de ces frottis démontre que les amas en question se composaient d'un conglomerat de poly-et de mononucléaires, avec prédominance de ces derniers. Les uns et les autres, mais surtout les mononucléaires, contenaient un grand nombre de bactéries, mais la plus grande partie de ces bâtonnets se trouvaient à l'état libre; il n'était pas rare aussi de rencontrer des préparations où des amas plus ou moins volumineux de bacilles étaient entourés d'un groupe de mononucléaires, disposés en couronne autour d'eux.

Des amas analogues, au nombre de deux, trois ou plus, se trouvaient aussi à la surface de l'épiploon, surtout dans ses replis; eux aussi, se laissaient facilement détacher.

Déjà, au bout de 48 heures, de petits épaisissements nodulaires, gros comme une tête d'épingle ou un grain de chènevis, existent çà et là dans le tissu même de l'épiploon; ils se confondent, sans limites précises, avec le tissu voisin. Chez les cobayes sacrifiés au bout de 6 à 7 jours, ces formations sont plus nettement circonscrites, se présentant alors sous forme de véritables nodules sphériques ou ovoïdes, de couleur blanc grisâtre, de volume variant d'un grain de mil à celui d'un grain de chènevis et parfois même plus considérable. Des nodules semblables se retrouvaient facilement 2 à 4 semaines après l'injection; leur nombre était variable; parfois de 3 à 4; d'autres fois, comme chez le cobaye n° 4, il s'élevait jusqu'à 20 à 30. A des intervalles plus éloignés de l'injection, ces nodules semblaient devenir moins nombreux; toutefois nous les avions retrouvés chez tous les cobayes examinés. Le cobaye n° 28, auquel on avait injecté une dose de microbes 15 à 20 fois moindre que la dose ordinaire, ne faisait pas exception à la règle. Il faut dire toutefois que dans quelques cas, à l'autopsie, même à un examen attentif, ces formations semblaient faire défaut; en réalité, elles existaient, mais

étaient difficiles à distinguer d'avec le tissu du pancréas. Lorsque tout l'épiploon est excisé avec la glande et qu'ils ont été durcis dans l'alcool, les nodules deviennent plus nets, se distinguant du pancréas par leur couleur plus blanche. Si dans ces conditions, la présence des nodules n'était pas encore relevée, on les verra lorsque, l'épiploon ayant été monté, on éclaircit les coupes par le chloroforme et la paraffine ; les nodules apparaissent alors sous forme de points plus opaques.

Quelle est la structure microscopique de ces nodules ? Sans vouloir entrer dans des détails, disons seulement que durant les premiers jours les nodules représentent une agglomération de cellules mono-et polynucléaires (ces derniers étant surtout abon dantes dans la partie centrale du nodule). Au milieu et à l'intérieur se trouvent une multitude de bactéries de la lèpre (fig. 3.) Le nodule se confondait, sans limites précises, avec le tissu environnant. Les nodules âgés de une à deux semaines présentent un autre tableau (fig. 4) : la partie centrale, dépourvue de vaisseaux, est occupée principalement par des leucocytes polynucléaires, disposés au milieu d'une masse granuleuse se colorant bien par les couleurs acides. Ces polynucléaires sont en partie bien conservés, en partie déjà désagrégés, ou en voie de désagrégation ; entre eux se trouvent quelques cellules épithélioïdes ; plus près de la périphérie, on trouve un tissu formé surtout de cellules épithéliodes et d'une quantité notable de cellules géantes ; enfin, formant capsule, des cellules dites rondes et fusiformes, les dernières occupant surtout la périphérie. Des amas de bactéries existent au centre du nodule, elles sont moins nombreuses à la périphérie où elles sont en majeure partie englobées par des cellules épithélioïdes et des cellules géantes. Dans la capsule, les bactéries sont relativement en petit nombre ; toutefois on trouve çà et là des cellules « rondes » ou fusiformes renfermant une ou plusieurs bactéries.

Les nodules âgés d'un mois présentaient une structure à peu près analogue, avec cette différence que leur partie centrale était à ce moment presque entièrement formée par un nombre colossal de cellules épithélioïdes et un grand nombre de cellules géantes. — Dans les nodules âgés de deux à trois mois et demi, le tableau changeait en ce sens qu'une partie plus ou moins grande de cellules épithéloïdes se désagrégeait et se transfor-

mait en masses granuleuses, se colorant bien par les acides. — Enfin, chez un cobaye injecté six mois auparavant, le centre des nodules (fig. 1) était transformé en un tissu fibreux ou en une masse presque amorphe ne prenant plus les couleurs acides et infiltrée de sels calcaires. Cette calcification commençait par la partie la plus centrale du nodule; quelques nodules étaient entièrement calcifiés, à l'exception de la capsule.

La capsule conservait à peu près la même structure que dans les nodules plus jeunes et, par places, quelques cellules renfermaient des bactéries isolées de la lèpre.

Quant à ces dernières, elles se trouvaient en nombre considérable dans tous ces nodules, principalement au centre; mais il semble qu'avec le temps leur nombre diminue graduellement. Les deux ou trois premiers mois, on ne peut pas dire avec certitude qu'ils fussent digérés; mais, chez un cobaye de six mois, les formes dégénératives étaient assez fréquentes (fig. 10). Cette dégénérescence se marquait en ce que les bactéries fixaient moins bien les matières colorantes; des bâtonnets n'étaient colorés qu'à une seule extrémité, l'autre se présentant sous forme d'un corpuscule brillant incolore : on trouvait enfin des bacilles et des amas de bacilles qui, tout en ayant conservé leur forme, perdaient complètement la propriété de se colorer et se présentaient alors sous forme de bàtonnets brillants (infiltration par des sels minéraux ?)

Chez quelques cobayes, surtout chez le cobaye n° 28, nous avions constaté des figures (fig. 2 et 5) qui rappelaient la « dégénérescence jaune », décrite par le professeur Metchnikoff[1] dans la tuberculose des spermophiles (*Spermophilus guttatus Temminck*). Il faut cependant reconnaître ce fait que la plupart des bactéries trouvées dans les nodules conservaient leur aspect normal.

Dans le reste du tissu épiploïque de tous les cobayes, on trouvait des formations qu'on pouvait considérer comme des nodules microscopiques de même nature que ceux décrits plus haut. En plus, on pouvait toujours trouver çà et là des bactéries isolées, phagocytées par des cellules endothéliales et, parfois, conjonctives qui font partie constituante de l'épiploon.

1. Metchnikoff, Ueber die Phagocytäre Rolle der Tuberkulose Riesenzellen *Virch. Arch.*, 1888, t. CXIII, p. 63.

Au cours de notre étude, nous nous sommes demandé si les bactéries de la lèpre pénètrent dans d'autres organes. Pour résoudre cette question, nous avions pratiqué des coupes du foie, de la rate, des reins, des ganglions mésentériques et des poumons. Nous avions fait aussi des frottis de la moelle osseuse, et dans quelques cas nous en avons fait des coupes. Dans tous les organes énumérés, à l'exception des poumons et, fait particulièrement intéressant, des ganglions mésentériques des cobayes, examinés au plus tard 1 mois après l'infection, les bâtonnets de la lèpre pouvaient être retrouvés avec une constance plus ou moins grande, mais en nombre toujours relativement très faible.

C'est dans la rate et le foie que les bactéries se retrouvaient avec le plus de régularité, et toujours plus nombreuses dans la rate que dans tous les autres organes.

Dans les reins et la moelle osseuse, la présence des bactéries était loin d'être constante.

Pour donner une idée de leur quantité, il suffit de dire que les bacilles se trouvent généralement, dans presque toutes les coupes de la rate, au nombre de 3 à 5, quelquefois plus. Notons cependant qu'il fallait quelquefois examiner un nombre considérable de coupes avant de trouver 5 ou 10 bactéries dans toutes les préparations examinées. La recherche des bactéries dans le foie était toujours plus longue; toutefois, dans quelque cas, on peut dès la première coupe tomber sur de petits amas de 3 à 5 bacilles. Les reins étaient encore plus pauvres en bacilles, et il nous arrivait quelquefois d'examiner un certain nombre de coupes d'un des reins sans le moindre résultat, et de n'en trouver dans l'autre que quelques exemplaires sur 15 ou 20 coupes. Quant à leur nombre dans la moelle osseuse (fémur), on les trouvait sur des frottis au nombre de 5 à 10. Le temps écoulé depuis l'injection ne faisait guère varier le nombre des bactéries. Tout ce que nous pouvons dire, c'est que l'on trouvait des bacilles aussi bien 2 jours que 1 mois après l'injection. Chez les cobayes examinés après un laps de temps plus long, on ne trouvait des bactéries que dans l'épiploon.

Les bacilles étaient le plus souvent inclus dans des cellules, le plus souvent dans des mononucléaires, parfois aussi dans des cellules endothéliales de la rate; dans le foie, on les trouvait

dans les cellules de Kupfer, dans les cellules endothéliales et conjonctives (?) de l'adventice des vaisseaux de petits calibres.

Dans la moelle osseuse, ils étaient englobés par les macrophages et les éléments endothéliaux(?). Dans les reins, les bactéries se trouvaient dans les glomérules de Malpighi, apparemment dans les éléments endothéliaux, parfois aussi dans les cellules du stroma. Il était parfois difficile de dire si les bactéries étaient libres ou bien englobées ; dans quelques cas, cependant, il semblait que les bactéries étaient libres. La présence des bactéries ne s'accompagnait d'aucun phénomène réactionnel du tissu voisin ; on ne trouvait, non plus, rien d'anormal dans aucun des organes, sauf la rate. Dans la rate, au contraire, on trouvait toujours une accumulation considérable des polynucléaires, que l'on constatait facilement sans avoir besoin de comparer avec les coupes de contrôle. Notons que ce phénomène se rencontrait à un degré plus ou moins marqué chez tous les cobayes examinés, alors même qu'on ne trouvait de bactéries dans aucun autre organe que l'épiploon. Cette accumulation de polynucléaires était, nous semble-t-il, plus prononcée chez les cobayes sacrifiés au cours des 15 premiers jours après l'inoculation.

Tous ces faits, qui se rapportent aux diverses phases de la lutte de l'organisme contre les bacilles lépreux, peuvent dans leur ensemble être interprétés de la façon suivante :

Les bactéries introduites dans la cavité abdominale provoquent rapidement une leucocytose intense ; les phagocytes s'emparent des bactéries qu'ils dirigent progressivement vers les stomates de l'épiploon où probablement s'introduisent aussi un grand nombre de bactéries libres.

Chemin faisant, cette masse de bacilles trouve un très grand nombre de phagocytes venus à leur rencontre, qui les arrêtent.

Les bacilles se trouvent de cette façon immobilisés dans divers points de l'épiploon, et donnent ainsi naissance aux nodules macro-et microscopiques décrits plus haut. Une partie de bacilles libres ou englobés arrive sans doute à se dégager de l'obstacle ; dans ce cas, ils sont ensuite ou bien arrêtés par un nouvel amas de leucocytes, ou bien englobés par des cellules conjonctives et endothéliales de l'épiploon. Dans l'exsudat péritonéal, les microphages n'interviennent activement que durant le premier jour après l'injection, et comme, d'autre part, dans les

nodules épiploïques, ces leucocytes commencent à succomber déjà au cours de la première semaine de l'expérience, il est évident que la lutte ultérieure, ou tout au moins la lutte sur place, a surtout lieu grâce à l'intervention des macrophages. Les bacilles lépreux jouissant d'une résistance remarquable à l'action des sucs digestifs des phagocytes, un organisme résistant réagit naturellement par des moyens de défense plus efficaces. Cette réaction a pour résultat la transformation des points d'immobilisation, dont nous avons parlé, en des productions composées d'un nombre très considérable de cellules épithéliales et géantes destinées à lutter directement contre les bactéries. De plus, pour mieux circonscrire le champ de bataille, l'organisme entoure ces foyers de lutte phagocytaire prolongée, d'une enveloppe ou capsule formée des cellules dites « rondes » et de cellules conjonctives fusiformes. Enfin, au fur et à mesure que, sous l'influence de causes diverses, les phagocytes succombent en se transformant en une masse granuleuse amorphe, l'organisme met en mouvement un autre puissant moyen de défense, l'infiltration calcaire des nodules.

Nous avons vu plus haut qu'un petit nombre de bactéries peut arriver jusque dans les viscères; mais comme leur nombre est très restreint, comparé à celui des bâtonnets restés dans l'épiploon, il est évident que c'est bien à ce dernier organe qu'appartient le rôle principal dans la lutte de l'organisme contre les bacilles lépreux injectés dans le péritoine des cobayes.

Bien que, chez aucun de nos animaux, nous n'ayons constaté la disparition complète des bacilles lépreux, nos expériences prouvent, une fois de plus, la résistance des cobayes vis-à-vis du bacille de la lèpre.

Tous les animaux dont nous venons de parler ont été sacrifiés moins de 6 mois après l'injection, et semblaient doués d'une immunité solide.

Cependant, chez un cobaye conservé pendant près de 8 mois, les bacilles ont persisté dans l'exsudat jusqu'à la mort!

Dans le courant du 6e et du 7e mois, ils n'étaient plus assez nombreux pour qu'on pût déceler leur présence à chaque examen. Un certain nombre d'entre eux présentaient des altérations comme s'ils étaient en voie d'être digérés. Au 8e mois, la recherche des bactéries dans l'exsudat péritonéal était de nouveau

plus facile, et dans le liquide retiré 1 heure avant de sacrifier le cobaye, elles étaient notablement plus nombreuses qu'auparavant. Dans un mononucléaire, nous avons à ce moment rencontré un petit amas de bactéries intactes (fig. 6). Ces amas ne se voient ordinairement qu'au cours des premiers mois qui suivent l'injection, et il y avait longtemps que nous ne les avions plus observés chez le cobaye en question.

L'animal ne présentait rien d'anormal pendant tout le cours de l'observation. Il avait notablement maigri à un moment donné; puis il se mit à augmenter de poids, et le jour de l'autopsie il pesait 100 grammes de plus qu'au début de l'expérience. L'autopsie ne révéla rien d'anormal et l'examen attentif de l'épiploon ne décela aucun nodule.

Une partie de l'épiploon étendue sur une lame montra facilement des bacilles de la lèpre; ces derniers étaient logés dans des îlots cellulaires microscopiques analogues à ceux décrits plus haut. On trouva, en plus, des bactéries isolées, bien conservées, phagocytées par des éléments endothéliaux et conjonctifs. Le reste de l'épiploon et du pancréas ont été fixés dans l'alcool; le traitement ultérieur de ces pièces, et notamment l'éclaircissement par le chloroforme. ont permis de constater au voisinage du pancréas deux îlots nodulaires moins transparents, dont un du volume d'un grain de chènevis, l'autre deux fois plus volumineux; le premier était assez nettement circonscrit : le second se confondait insensiblement avec le tissu environnant. Ces deux nodules furent montés séparément dans la paraffine. Sur les coupes du reste de l'épiploon, on a pu constater des figures démontrant, mieux que celles des coupes provenant des autres cobayes, le fait que les nodules épiploïques, tout au moins les nodules microscopiques, peuvent subir la transformation fibreuse et emprisonner ainsi les plus résistantes parmi les masses bactériennes.

Les coupes du premier des deux nodules présentaient des modifications analogues à celles observées chez le cobaye sacrifié le 6e mois; ce nodule était à moitié calcifié, tout en étant cependant très riche encore en bactéries ; la plupart de ces dernières étaient bien conservées, mais quelques-unes étaient dégénérées.

Mais c'est surtout dans la seconde production nodiforme qu'on a trouvé des modifications intéressantes : cette produc-

tion étaitconstituée par un grand nombre de cellules épithélioïdes et un nombre assez considérable de cellules géantes, logées dans les mailles d'un réseau de tissu cellulaire lâche. A la périphérie, cette masse cellulaire était entourée d'une couche de tissu conjonctif formé de cellules « rondes » et fusiformes; toutefois, ces dernières ne formaient pas par leur ensemble de capsules, comme nous l'avons vu pour les autres nodules, mais se confondaient avec le tissu du voisinage, sans présenter des limites nettes. Au milieu de cet amas de cellules épithélioïdes et géantes du centre du nodule, il y avait aussi quelques espaces arrondis ou ovalaires, entourés chacun d'une capsule fibreuse plus ou moins épaisse, pauvre en éléments cellulaires. Ces espaces étaient remplis par des masses de bactéries serrées les unes contre les autres, absolument intactes et se colorant très bien, disposées en amas (fig 8). Dans aucun de ces derniers, l'examen le plus attentif n'a permis de déceler des formes dégénératives : tous les bacilles ressemblaient les uns aux autres. Pour caractériser en deux mots ces agglomérations bactériennes, on peut dire qu'elles donnent l'impression d'une jeune colonie de culture pure (fig. 9).

Il est difficile de dire ce que représentent les espaces où logent les masses bactériennes : s'agit-il de modifications pathologiques, de vaisseaux lymphatiques à parois épaissies, ou bien sont-ce des productions néoformées? La seconde hypothèse nous semble plus probable ; nous y reviendrons plus loin; pour le moment, nous attirons l'attention sur ce fait qu'entre les couches de la capsule il y avait de petits amas bactériens où les bacilles étaient aussi bien conservés que dans les gros amas décrits plus haut. L'examen attentif de la préparation démontre que la plupart de ces petits amas sont réellement logés entre les couches de la capsule. Si nous soulignons ce fait, c'est que nous sommes enclins à penser que tout au moins quelques-uns des espaces en question étaient en réalité complètement remplis de bactéries; le tableau que représentent les figures 8 et 9 peut s'expliquer par cette circonstance qu'au moment de la préparation des coupes, des parties de ces amas avaient pu se détacher et tomber dans la région voisine de la coupe.

Tandis que dans les amas décrits ci-dessus, aucune des bactéries ne présentait de traces de dégénérescence, un grand nombre de celles qui sont englobées par les cellules épithélioïdes et

géantes, et qui forment la masse principale du nodule, présentent des altérations de désagrégation décrites plus haut (fig. 2).

Si nous ajoutons maintenant que dans les autres parties de l'épiploon nous avons également trouvé un certain nombre de nodules microscopiques ayant la même structure que celle que nous venons de décrire, et qui ne contenaient pas d'amas considérables de bactéries, nous aurons épuisé l'énumération des principales lésions trouvées à l'examen microscopique de l'épiploon.

Avant d'aborder l'interprétation de ces modifications, signalons que l'examen des organes internes a facilement permis de déceler, dans la rate et les reins, un petit nombre de bâtonnets de la lèpre. On n'a trouvé d'autre altération dans aucun des organes examinés, sauf une leucocytose polynucléaire dans la rate comme chez tous les autres cobayes. Nous ne pouvons pas dire que le nombre de bactéries trouvées dans les organes de ce cobaye fut plus considérable que dans ceux des cobayes sacrifiés au cours des premiers mois qui suivirent l'injection. Disons seulement que dans la rate on pouvait les observer au nombre de plusieurs exemplaires par coupe ; dans les reins ils étaient moins nombreux; pas de modifications réactionnelles dans les zones circumvoisines. Les rapports de ces bactéries avec les éléments cellulaires des tissus étaient les mêmes que chez tous les autres cobayes.

Quant aux gros amas de bacilles trouvés chez ce dernier cobaye, ils nous ont d'autant plus surpris que les examens faits sur les cobayes précédents nous avaient convaincu que l'organisme prend facilement le dessus dans la lutte contre le bacille lépreux. Nous avons pensé d'abord que ces accumulations de bacilles étaient dues à ce qu'au moment de l'injection des amas bactériens avaient été entraînés par le courant de la lymphe dans un vaisseau où ils avaient formé thrombus.

Mais s'il en était ainsi, le thrombus aurait provoqué des phénomènes de réaction, et après 8 mois nous devrions trouver une organisation du thrombus, ou, au moins, la formation d'un nodule semblable à ceux déjà décrits. De plus, parmi les bactéries ainsi groupées, un certain nombre auraient subi une dégénération manifeste, d'autant plus que dans la matière injectée il y en a toujours en voie de dégénérescence. Il est difficile aussi

de comprendre comment, dans un espace aussi limité, une série de thrombus auraient pris naissance; chez aucun des autres cobayes d'expérience nous n'avons rien vu de semblable. Cette hypothèse n'explique pas non plus la présence des bacilles dans les parois des prétendus vaisseaux lymphatiques.

La disposition des bactéries, les unes par rapport aux autres, la conservation complète de leur forme et de leur réaction tinctoriale donnent à ces amas l'aspect de jeunes colonies d'une culture pure du bacille lépreux. Ces bacilles ont en effet l'apparence jeune et se distinguent nettement de ceux contenus dans les cellules épithélioïdes et les cellules géantes voisines, et qui sont en majorité désagrégés. Tous ces faits nous incitent à supposer que dans ce cas il y a eu multiplication des bactéries. La signification des espaces où sont logées des colonies bactériennes est plus difficile à interpréter. Toutefois nous ne croyons pas que ces espaces puissent représenter des coupes transversales des vaisseaux lymphatiques. En effet, leur disposition en groupes, l'épaisseur de leurs parois, l'absence complète de fibres élastiques (coloration d'après Weigert et Unna-Taenzer), puis la présence de bactéries dans cette paroi même, tout cela est contraire à une semblable interprétation; une autre nous paraît plus probable : les espaces en question ne seraient autre chose que des fentes lymphatiques distendues sous l'influence de la multiplication bactérienne. On ne peut pas dire d'une façon certaine si la formation des parois de ces cavités est le résultat d'une réaction répondant à la prolifération bactérienne, ou s'il s'agit de parois préformées développées avant le début de celle-ci. Quant à la multiplication bacillaire, a-t-elle eu lieu peu de temps après l'injection ou bien à une date plus éloignée, notamment au cours des derniers mois?

La dernière hypothèse nous paraît plus plausible, et en sa faveur parlent les considérations suivantes. Nous avons vu sur les cobayes précédents que l'injection de bactéries s'accompagne de formation de nodules dans l'épiploon, nodules qui représentent des foyers dans lesquels se passe la lutte avec les bacilles injectés; nous avons également vu que ces nodules subissent la transformation crétacée ou fibreuse, mais qu'ils conservent néanmoins toujours un grand nombre de bacilles complètement intacts. Il n'y a dès lors rien d'impossible à ce que ces bactéries,

sous l'influence d'une cause quelconque, commencent à se multiplier, à écarter les tissus environnants et à amener la série des phénomènes que nous avons observés chez notre dernier cobaye. Si l'on admet cette interprétation, on comprend pourquoi on a pu trouver facilement des bacilles dans l'exsudat au cours des dernières semaines, pourquoi des bactéries existaient dans la rate et les reins d'un cobaye de 8 mois, tandis que chez les autres il n'y en avait plus à partir d'un mois après l'injection. Nous croyons donc que nous sommes tombé sur un fait démontrant la possibilité de la multiplication des bactéries de la lèpre chez les cobayes.

Le tableau ci-joint montre que trois de nos animaux en expérience ont succombé à la tuberculose; ce fait, ainsi que ceux rapportés par quelques autres auteurs, nous a suggéré l'idée de faire quelques expériences sur des cobayes en leur introduisant une culture peu virulente de bactéries tuberculeuses en même temps que l'émulsion lépreuse. Les résultats ont été peu probants.

Puisque nous sommes en train de parler de la tuberculose, nous croyons nécessaire, à propos du cobaye de 8 mois, d'insister sur ce point que ni les lésions histologiques de l'épiploon, ni l'ensemble des autres phénomènes ne nous autorise à supposer chez cet animal une infection tuberculeuse.

***

Injection de l'émulsion lépreuse sous la peau. — Nous serons bref sur ce point, étant donné le petit nombre d'expériences et la courte durée de ces observations.

A la suite des injections de l'émulsion sous la peau du ventre, on observait chez quelques cobayes, au bout de 8 jours, la formation d'une petite infiltration mal circonscrite. Cette infiltration persistait 2-3 semaines, puis disparaissait.

Si 24 ou 48 heures après l'injection on recueillait un peu d'exsudat au niveau du point injecté, on pouvait constater que cet exsudat présentait essentiellement les mêmes caractères que dans l'injection intrapéritonéale, avec cette différence, toutefois, qu'il était plus riche en cellules polynucléaires et contenait pas mal de bactéries libres. Toutefois, d'après l'examen des coupes provenant du cobaye n° 64, sacrifié au bout de 8 jours, les bac-

téries étaient englobées par les éléments cellulaires du tissu inflammatoire, lesquels formaient le substratum anatomique de l'infiltration. L'examen des organes internes des deux cobayes, dont un fut sacrifié 48 heures et l'autre 8 jours après l'injection sous-cutanée, a démontré qu'avec ce mode d'introduction, les bactéries pénètrent en petite quantité dans divers organes : foie, rate, épiploon, reins; en plus, on en trouvait toujours dans les ganglions lymphatiques de l'aine. Chez le cobaye n° 91, sacrifié au bout de 38 jours, on n'a trouvé de bactéries que dans les ganglions lymphatiques de l'aine et, en petit nombre, dans le tissu cellulaire sous-cutané de la région où a été pratiquée l'injection. Chez deux cobayes auxquels l'injection avait été faite sous la peau du dos (n° 1 et n° 7), on n'a trouvé des bactéries que dans les ganglions de l'aine; enfin, chez le cobaye n° 40, sacrifié au bout de 24 jours, en dehors des ganglions lymphatiques, on a réussi, après de longues recherches, à démontrer la présence de quelques bactéries sur des coupes de la rate.

Se basant sur ce fait, on pouvait penser que l'injection sous la peau du ventre crée des conditions plus favorables à la pénétration des microbes dans les organes internes. Mais dans l'expérience suivante chez un cobaye, auquel on avait injecté sous la peau du dos une émulsion lépreuse, stérilisée à l'autoclave à 120° durant 1 heure, on a pu facilement trouver, au bout de 48 heures, des bactéries non seulement dans les ganglions inguinaux, mais aussi dans la rate, le foie et les reins.

Quant à la quantité de bactéries trouvées, dans toutes ces expériences, dans les organes internes, nous pouvons dire qu'elle était à peu près la même que dans les injections intrapéritonéales, c'est-à-dire relativement très peu considérable.

Les rapports entre les bactéries et les éléments cellulaires étaient également les mêmes.

Les ganglions lymphatiques, surtout du côté correspondant au siège de l'injection, étaient plus riches en bacilles que les autres organes; chaque coupe en contenait de 10 à 30 exemplaires, et les coupes provenant d'organes des cobayes n° 91 et surtout de celui n° 1, étaient encore plus riches. Ces bacilles n'y étaient pas à l'état libre, mais toujours englobés par les macrophages. Une seule fois nous avons constaté des altérations accompagnant la présence de bactéries dans le ganglion ingui-

nal. C'était chez le cobaye n° 1, dont les ganglions lymphatiques contenaient un nombre de bacilles notablement plus élevé que ceux des autres. Sur les coupes des ganglions de ce cobaye, on voyait que le tissu ganglionnaire renfermait dans son épaisseur tout une série de petits foyers à contours nets, composés de cellules épithélioïdes et géantes; c'est précisément dans ces cellules que se trouvaient les bactéries (fig. 4). Nulle part il n'y avait de dégénérescence caséeuse, ni de productions analogues aux tubercules de Wagner-Schüppel. L'examen microscopique des organes internes n'a révélé rien d'anormal.

Ces lésions n'ayant été constatées que dans un seul cas, nous n'entrons pas dans l'appréciation de leur signification, nous dirons simplement qu'il y a, sans doute, une analogie entre les altérations que nous avions toujours constatées dans l'épiploon de cobayes injectés par voie péritonéale.

Signalons encore le fait suivant, toujours constaté par nous : chez tous les cobayes, aussi bien dans l'injection sous-cutanée que dans l'injection intra-péritonéale, il y avait une leucocytose polynucléaire très marquée dans la rate.

Nous avons vu plus haut que les bacilles lépreux opposent une résistance énergique à l'action digestive des phagocytes. Il était intéressant de savoir quelle est, à ce point de vue, la résistance des bactéries soumises à une haute température.

Après avoir stérilisé une émulsion lépreuse à l'autoclave à la température de 120° pendant 1 heure, nous l'avons injectée à 3 cobayes dans la cavité péritonéale. Nous avons observé, à l'examen de cet exsudat péritonéal, les mêmes phénomènes que dans les expériences analogues avec l'émulsion non stérilisée, avec cette différence, cependant, que chez 2 cobayes les bactéries disparaissaient de l'exsudat après 6 à 7 semaines (le 3e cobaye a succombé au bout de 3 semaines). On n'a pas constaté dans l'épiploon de nodules macroscopiques. Nous n'avons pas étudié d'une façon plus détaillée les altérations de l'épiploon, nous bornant à examiner les préparations faites avec de petits lambeaux d'épiploon étendus sur des lamelles. Aussi, pouvons-nous seulement dire que 10 semaines après l'injection, la très grande majorité des bactéries retrouvées était complètement intacte. Résumant les résultats de nos recherches, nous croyons pouvoir en tirer les conclusions suivantes :

1. — Vingt-quatre heures après l'injection intra-péritonéale de bacilles lépreux, on constate, à l'examen de l'exsudat, que presque tous les bacilles sont déjà englobés. A partir du 3e jour, la phagocytose se fait exclusivement au moyen des mononucléaires.

2. — C'est dans l'épiploon que se passe surtout la lutte avec les bacilles lépreux.

3. — Dans cette lutte, le principal rôle revient aux macrophages qui, en l'espace de 8 mois, arrivent à digérer un certain nombre de bactéries.

4. — 8 mois après l'injection, les bacilles sont encore extrêmement nombreux, et la plupart sont parfaitement intacts.

5. — Parmi les bacilles injectés dans le péritoine, un petit nombre pénètre toujours dans les organes internes, et chez les cobayes sacrifiés, au plus tard 1 mois après l'injection, on trouve les bacilles avec une régularité plus ou moins grande, en dehors de l'épiploon, dans la rate, le foie, les reins et la moelle osseuse.

6. — Lorsque des bacilles lépreux sont introduits sous la peau, on en rencontre également un petit nombre dans la rate, le foie, les reins, l'épiploon; les ganglions de l'aine en contiennent toujours une plus grande quantité.

7. — Dans la rate, il existe chez tous les animaux en expérience une leucocytose polynucléaire plus ou moins marquée.

8. — Chez les animaux auxquels on injecte des bacilles préalablement soumis pendant 1 heure à l'action d'une température de 120°, on constate que 2 mois 1/2 après l'injection ils sont encore nombreux dans l'épiploon et parfaitement intacts.

9. — Chez un cobaye inoculé par voie péritonéale et sacrifié au bout de 8 mois, on a trouvé dans l'épiploon des altérations qui parlent en faveur de la multiplication possible des bacilles lépreux dans l'organisme du cobaye.

En terminant, nous prions notre éminent maître M. Metchnikoff de vouloir bien accepter notre respectueuse reconnaissance pour nous avoir fourni le sujet de ce travail, et nous avoir bien voulu nous faire le grand honneur de nous agréer parmi ses nombreux élèves. Nous adressons également nos plus vifs remerciements à notre très estimé ami M. Besredka, qui s'est toujours montré prêt à nous aider de ses conseils.

EXPÉRIENCES Dates.	Numéros des cobayes.	POIDS jour de l'injec.	POIDS jour de la mort	L'ANIMAL est vivant, mort (+), ou a été sacrifié au bout de	LIEU où a été faite l'injection.	Les bactéries ont-elles disparu de l'exsudat et à quel moment ?	ÉNUMÉRATION DES ORGANES examinés au microscope. (Ceux dans lesquels on a trouvé des bactéries lépreuses sont en *italique*.)	REMARQUES
Exp. I. 16/IV 1901.	56	430	390	9 semaines.	Péritoine.	8e semaine.	Tuberculose des ganglions mésentériques ; au microscope, lésions caractéristiques de tuberculose. Inocul. sous-cutanée d'un autre cobaye. Mort au bout d'un mois de tuber. général.	
2 cobayes.	58	600	330	3 mois 1/2 (+).	—		Macroscop. : tuberculose généralisée caractéris. Microscop., les tuberc. des poumons et du foie ont la structure typique des tubercules de Wagner-Schüppell. Inoc. intra-périt. à un autre cobaye. Mort au bout de 4 mois 1/2 sans présenter des lésions manifestes de tuberculose.	
Exp. II.	81	590	520	6 jours.	Péritoine.		*Epiploon, foie, rate, reins*, ganglions mésentér., poumon, *moelle osseuse* (?).	Le cobaye nº 45 a présenté macroscopiquement des lésions typiques de tuberculose. Inoculation à 2 cobayes (une sous-cutanée, l'autre intrapéritonéale). Le premier a succombé avec phénom. de tuberc. généralisée au bout de 15 jours, l'autre au bout de 10 jours.
25/IV	24	315	325	15 jours.	—		*Epiploon*, foie, rate, reins, ganglions mésentériques, poumons, moelle osseuse.	
4 cobayes.	45	310	200	7 semaines (+).	—	4e semaine.		
Exp. III.	85	320	320	48 heures.	Péritoine.		*Epiploon, foie, rate, reins*, ganglions mésentér., poumon, moelle osseuse.	Les ensemencements faits avec du sang du cœur et avec l'exsud. périt. du cobaye nº 77 restent stériles. Une partie de l'épiploon, transf. en émulsion (elle contenait des bacil. lépreux) est injectée dans le péritoine d'un cobaye. Mort au bout de 4 mois 1/2 de cause accidentelle. Nº 80. L'ensem. du sang du cœur a donné des bacil. coliformes. Inocul. de contrôle comme dans nº 77, mort au bout de 3 jours.
11/V	72	320	390	7 jours.	—		*Epiploon, rate, foie*, reins, moelle osseuse.	
	76	390	425	16 jours	—		*Epiploon, rate, foie*, reins, ganglions de l'aine, *moelle osseuse*.	
7 cobayes.	74	355	400	1 mois.	—		*Epiploon, rate, foie*, reins, poumons, ganglions mésentér., *moelle osseuse*.	
	77	340	250	9 semaines (+).	—		*Epiploon*, rate, foie, moelle osseuse.	
	80	450	370	3 mois (+).	—		*Epiploon*, rate.	
Exp. IV.	21	405	450	48 heures.	Péritoine.		*Epiploon, foie, rate*, moelle osseuse.	
28/V	98	445	420	2 mois.	—		*Epiploon*, foie, rate, ganglions mésent., reins, poumons, moelle osseuse.	
6 cobayes.	90	510	615	8 m. et 8 j.	—		*Epiploon, rate*, foie, *reins*, gangl. mésent., poumons, moelle osseuse.	

EXPÉRIENCES Dates.	Numéros des cobayes.	POIDS jour de l'injec.	POIDS jour de la mort	L'ANIMAL est vivant, mort (+), ou a été sacrifié au bout de	LIEU où a été faite l'injection.	Les bactéries ont-elles disparu de l'exsudat et à quel moment?	ÉNUMÉRATION DES ORGANES examinés au microscope. (Ceux dans lesquels on a trouvé des bactéries lépreuses sont en *italique*.	REMARQUES
Exp. IV. (*Suite.*) 28/v	64	375	370	7 jours.	Sous la peau.		*Peau et tissu cell. sous-cut. au niveau de l'inocul.*, *épiploon*, *rate*, *ganglions inguinaux des deux côtés*, ganglions mésent., moelle osseuse, *foie*, *reins*, poumons.	
6 cobayes.	63	380	410	48 heures.	—		Mêmes résultats que chez le cobaye nº 64 ; mais pas de bactéries dans le foie et les reins.	
Exp. V. 23/VII	17	540	380	7 semaines (+).	Péritoine.		*Epiploon.*	Les cobayes 17 et 18 ont succombé, ainsi que deux autres, de cause accidentelle.
	18	660	460	7 semaines (+)			*Epiploon*, rate, foie.	
7 cobayes.	50	280	750	6 m. et 8 j.		Fin du 5e m	*Epiploon*, rate, foie, reins, ganglions mésentér., poumons, moelle osseuse.	Le cobaye nº 50 a grandi pendant la durée de l'expérience ; a été sacrifiée étant pleine.
Exp. VI.	1	440	330	26 jours.	Sous la peau du dos		Epiploon, rate, poumons, 2 *ganglions inguinaux*.	Les cobayes nos 28, 29, 20, 37, ont reçu des doses d'émulsion environ 15 à 20 fois moindres que les autres.
21/IX	7	375	345	[illegible]8 jours.	—		Epiploon, rate, foie, reins, moelle osseuse, ganglions mésentér., *inguinaux*, *tissu cellul. sous-cut. au niveau de l'inoc.*	Le cobaye nº 60 a reçu, deux heures avant l'injection de l'émulsion lépreuse, la moitié d'une culture fraîche de *proteus* sur gélose.
13 cobayes	91	295	285	38 jours.	Sous la peau du ventre.		Epiploon, rate, *ganglions inguinaux*.	
	28	530	710	15 semaines.	Péritoine.	Fin du 2e m.	*Epiploon*, rate, moelle osseuse.	
	29	410		Survit.	—	Fin du 3e m.		
	20	370		—	—	—		
	37	455		—	—	—		
	60	585	670	17 semaines.	—	6e semaine.	*Epiploon.*	
	73	615	400	3 semaines (+)	Émulsion stérilisée.		*Epiploon.*	
	47	515	615	10 semaines.	—	7e semaine.	*Epiploon.*	
Exp. VII.	40	540	630	24 jours.	Sous la peau du dos		*Rate*, *ganglions de l'aine*, épiploon, reins,	
12/XI	2	460	440	56 heures.	Émulsion stérilisée.		Epiploon, *rate*, *foie*, *reins*, *ganglions de l'aine*, moelle osseuse.	
7 cobayes.	62	530	400	2 mois 1/2.	Péritoine (émulsion stérilisée.)		*Epiploon.*	
	67	740	Vit encore.					

BIBLIOGRAPHIE

1. Hansen. *Virchow's Archiv.*, 1880, B. LXXIX, S. 32.
2. Neisser. *Ibidem*, 1881, B. LXXXIV, S. 514.
3. Gaucher et Hillairet. 1881. *C. rend. de la Soc. de Biol.* Paris, p. 201.
4. Kobner. *Virchow's Archiv.*, 1882, B. LXXXVIII, S. 282.
5. Hansen. *Ibidem*, 1882, B. XC, S. 542.
6. Damsch. *Ibidem*, 1883, B. XCII, S. 20.
7. Campana. *Archiv. delle scienze mediche*, 1883, cité d'après Wesener.
8. Campana. *Clinica dermopat. e sifilopat. d. R. Univer. di Genova*, 1884, cité d'après Wesener.
9. Petrone. *Lo sperimentale*, 1884, p. 353, cité par *Wesener*.
10. Vossius. *Bericht über XVI Versamml. der Ophtalm. Gesellsch. zu Heidelberg*, 1884, S. 27. *Klinische Monatsblätter f. Augenheilk.* B. XXII.
11. E. Vidal. *La France médicale*, 1884, p. 942.
12. Melcher u. Orthmann. *Berliner Klin. Wochenschritf*, 1885, S. 193.
13. Melcher u. Orthmann. *Ibidem*, 1886, S. 135.
14. Leloir. *Traité pratique et théorique de la lèpre*. Paris, 1886, p. 235.
15. Thin, *Vierteljahresschrift f. Dermat. u. Syphilis*, 1886. S. 337.
16. Neisser. *Virchow's Archiv.* 1886, B. CIII, S. 355.
17. Schottelius u. Baumler. *Tageblatt der 59 Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte zu Berlin*, 1886, S. 379.
18. Arning. *Ibidem.*
19. Campana. *Vierteljahresschr. f. Derm. u. syph.*, 1887. S. 435.
20. Leloir. *Annales de Dermatologie et de Syphil.*, 1887, p. 625.
21. Wesener. *Münchener med. Wochenschr.*, 1887, N. 16-18.
22. Rake. *The Britisch Medical Journal*, 1887, I, S. 275, cité d'après Wesener.
23. Rake. *Ibidem*. 1888. *Ref. Centralblatt f. Bakteriologie*, B. IV, S. 590.
24. Vossius *Zeitschrift f. vergleichende Augenheilkunde*, 1889, B. VI, S. 1.
25. Katz. *Ref. Centralblatt f. Bakteriologie*, 1890, B. VII, S. 151.
26. Boinet. *Revue de Médecine*, 1890, X, p. 609.
27. Wesener. *Ziegler's Beiträge*, 1890, B. VII, S 614.
28. Vossius. *Ibidem*, 1890, B. VIII, S. 352.
29. Cornil et Babès. *Les Bactéries*, Paris, 1890, T. II.
30. Rake. *Berliner Klin. Wochenschrift*, 1891, S. 25.
31. Favrat u. Christmann. *Centralblatt f. Bakteriologie*, 1891, B. X, S. 119.
32. Hansen. *Festschrift Rudolf Virchow*, B. III, S. 63, Berlin, 1891.
33. Wolters. *Centralblatt f. Bakteriol.* 1893, B. XIII, S. 469.
34. Vnoukoff. *Contrib. à l'étude des bacilles de la lèpre*, Thèse; Kazan, 1893.
35. Tedeschi. *Centralblatt f. Bakter.*, 1893, B. XIV, S. 113.
36. Campana. *Riforma Medica*, 1895. T. III, p. 273.
37. De Luca. *Ibidem*, T. III, p. 810.
38. Campana et Broccheri. *Ibidem*, T. IV, p. 409.
39. Joseph. *Lehrbuch der Hautkrankheiten*, Leipzig, 1895, S. 298.
40. Olaya Laverde. *Lepra Conferenz*, Berlin, 1897, B. III, S. 485.
41. Hansen. *Ibidem*, B. I, Abth. II, S. 1.
42. Scanga. *Clinica dermosif. della Univ. di Roma*, 1898. *Ref. Monatsh. f. prakt. Dermat.*, B. XXVIII, S. 154.
43. Riatti. *Ibidem.*
44. Barannikow. *Journal russe des mal. cutanées et vénér.*, 1901, V. I, p. 715.
45. Azzarello. *Giornal. ital. d. mal. ven. e della pelle*, 1901. T. II, p. 137.
46. Emille Dacco. *Lepra. Bibliotheca internationalis*, B. II, H. III, S. 164.
47. Babes u. Kalindero. *Babes. — Die Lepra.* Wien, 1901, S. 46.

EXPLICATION DES PLANCHES XI ET XII

Les coupes ont été colorées par la fuchsine de Ziehl, et décolorées par l'alcool chlorhydrique (alcool absolu ou à 90° : 100 p. HCl : 2 p.) et colorées ensuite par le bleu de méthylène[1]. Microscope Zeiss.

Nous avons employé encore d'autres méthodes de coloration. Pour différencier les bacilles de la lèpre avec ceux de la tuberculose, nous avons eu recours à la méthode de Gram. Faisons remarquer que dans certains cas, les bacilles lépreux, colorés par la méthode de Gram, se décoloraient après 1-2 jours.

Fig. 1. — Cob. 50. Nodule épiploïque, 6 mois et 1/2 après l'injection. Le centre de ce nodule est calcifié. La coupe passe à côté de cette partie calcifiée. *a*, Capsule du nodule constituée par des cellules rondes et fusiformes; *b*, tissu normal de l'épiploon. La couche centrale du nodule présente une masse granuleuse amorphe. Les bacilles sont colorés en rouge. Oc. I. Ob. A. A.

Fig. 2. — Cob. 90. Cellules géantes et épithélioïdes d'une production épiploïque nodiforme (8 mois après l'injection). *a*, Cellule géante avec bacilles dégénérés et cristaux; *b*, cellule géante contenant des bacilles en « dégénérescence jaune ». Homog. Immers. 1/12. Oc. 5.

Fig. 3. — Cob. 21. Nodule épiploïque, 48 heures après l'injection. Hom. Immers. 1/12. Oc. 4.

Fig. 4. — Cob. 1. Ganglion lymphatique inguinal, 26 jours après l'injection sous-cutanée. Au centre, cellules épithélioïdes contenant des bacilles. A la périphérie, tissu ganglionnaire normal. Hom. Immers. 1/12. Oc. 1.

Fig. 5. — Cob. 28. Une partie du centre d'un nodule épiploïque du cobaye sacrifié, 3 mois et 1/2 après l'injection. Au milieu du tissu amorphe, on voit des bacilles intacts et d'autres dégénérés; *a*, « Dégénérescence jaune » des bacilles; *b*. bacilles décolorés. Hom. Immers. 1/12. Oc. 5.

Fig. 6. — Cob. 90. — Un mononucléaire trouvé dans l'exsudat péritonéal du cobaye le jour où il a été sacrifié, contenant un petit amas de bacilles. Même grossissement.

Fig. 7. — Cob. 90. Exsudat péritonéal du même cobaye, 7 mois après l'injection. *a*, Mononucléaire avec 2 bacilles en désagrégation; *b*, mononucléaire avec 1 bacille intact. Même grossissement.

Fig. 8. — Cob. 90. Partie centrale d'une production épiploïque nodiforme, 8 mois après l'injection. *aa*, Grands amas de bacilles dans les espaces; *b*, sorte d'enveloppe conjonctive autour de ces espaces; *c*. cellules épithélioïdes, contenant des bacilles dégénérés. Oc. 4. Ob. DD.

Fig. 9. — Cob. 90. Le point *a* de la préparation précédente, a un fort grossissement. Tous les bacilles sont intacts et présentent les mêmes dimensions. Hm. Im. 1/12. Oc. 5.

Fig. 10. — Cob. 50. Nodule épliploïque, 6 mois et 1/2 après l'injection. La partie centrale est fibreuse. Beaucoup de bacilles dégénérés à côté des bacilles intacts. Même grossissement.

Fig. 11. — Cob. 76. Nodule épiploïque, 2 semaines après l'injection. *a*, couche de leucocytes polynucléaires; *b*, couche des cellules épithélioïdes et géantes; *c*, couche des cellules rondes et fusiformes. Oc. 4. Ob. DD.

SUR LES SENSIBILISATRICES DES SÉRUMS ACTIFS
CONTRE LES SUBSTANCES ALBUMINOIDES

Par le Dr GENGOU.

(Travail de l'Institut provincial de bactériologie du Brabant, à Bruxelles.)

L'étude expérimentale, *in vivo*, de l'immunité anticholérique amena Pfeiffer[1] à observer un phénomène qui porte aujourd'hui son nom, et qui consiste dans la transformation granuleuse extracellulaire des vibrions de Koch que l'on injecte dans la cavité péritonéale de cobayes vaccinés contre le choléra. Le même phénomène s'observe encore, ainsi que le montra Pfeiffer, lorsqu'on introduit, dans la cavité péritonéale de cobayes neufs, des vibrions cholériques, préalablement mélangés avec un peu de sérum provenant d'animaux solidement immunisés contre ce microbe.

Cette transformation régressive des vibrions trahissait une action bactéricide énergique. Pfeiffer attribua à des cellules fixes, les cellules endothéliales du péritoine, la propriété de sécréter rapidement, dès qu'elles se trouvaient en présence de vibrions injectés dans la cavité, des matières très nocives pour ces microorganismes. Cette interprétation était inexacte, ainsi que Metchnikoff[2] le montra bientôt. Ce savant produisit *in vitro* la transformation granuleuse des vibrions, en les mélangeant à du sérum préventif additionné d'exsudat péritonéal provenant d'un cobaye neuf; cet exsudat ne renfermait pas de cellules endothéliales, mais bien des globules blancs.

Pfeiffer, dans ses expériences, n'avait pas constaté la transformation granuleuse des vibrions, lorsqu'il mélangeait ceux-ci, dans un tube, à du sérum provenant d'animaux vaccinés contre ces microbes. On peut supposer aujourd'hui qu'il employait du choléra-sérum trop vieux, et qui avait perdu ses propriétés bactériolytiques.

En effet, Bordet[3] obtint le phénomène de Pfeiffer *in vitro*, en

1. Pfeiffer, *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XVIII, 1894.
2. Metchnikoff, ces *Annales*, juin 1895.
3. Bordet, ces *Annales*, juin 1895.

mélangeant simplement, à des vibrions cholériques, du sérum préventif frais. Il démontra que la propriété bactériolytique du sérum anticholérique était due à la collaboration de deux substances, toutes deux nécessaires à la production du phénomène : l'une, la matière préventive *spécifique* ou *sensibilisatrice*, comme il l'a appelée, acquise par l'animal vacciné du fait de son immunisation, matière susceptible de se conserver longtemps, résistant à des températures assez élevées (65-70°); la seconde, l'*alexine* de Buchner, existant dans le sérum des animaux neufs comme dans celui des vaccinés, disparaissant assez rapidement dans les sérums conservés, facilement destructible par la chaleur (55°). A elle seule, l'alexine est peu active sur les vibrions normaux, mais elle le devient infiniment davantage quand ces vibrions ont subi l'influence de la sensibilisatrice du clolérasérum.

Cette notion de la dualité des substances bactériolytiques fut établie en 1895 par Bordet, grâce à une série d'expériences, parmi lesquelles la plus importante est la suivante. Si l'on chauffe du cholérasérum à 55°, on le prive de ses propriétés bactériolytiques; mais si à ce liquide on ajoute du sérum frais d'animal neuf (sérum par lui-même peu bactéricide), le cholérasérum récupère, dans son intégrité, la propriété bactériolytique énergique qu'il possédait avant le chauffage. Le sérum neuf frais (alexine) « réactive » donc le cholérasérum chauffé. En effet, dans un tel mélange, les deux substances dont la collaboration est nécessaire sont de nouveau présentes.

L'alexine, ainsi que l'ont démontré Metchnikoff et son école, est d'origine leucocytaire; c'est grâce à elle que, dans les études de phagocytose faites par Metchnikoff, se produisait la bactériolyse des vibrions à l'intérieur des globules blancs, même chez les animaux neufs.

Bordet[1] injecta ensuite à des animaux, non plus du vibrion cholérique, mais des globules rouges d'espèces différentes. Le sérum de ces animaux acquiert alors la propriété d'hémolyser *in vitro* ces globules, et ici encore cette action se produit par la collaboration de deux substances : l'alexine normale, destructible à 55°, et une sensibilisatrice acquise. Quelles sont les créations intimes qui se passent entre les substances actives du sérum et les cellules sensibles?

1. Bordet, ces *Annales*, octobre 1898

On savait que si l'on fait agir sur des globules rouges déterminés l'immunsérum approprié, préalablement chauffé à 55°, l'hémolyse ne s'opère pas, l'alexine ayant été détruite par le chauffage. Or, Ehrlich et Morgenroth[1] montrèrent que dans ces conditions, ces hématies fixent la sensibilisatrice de l'immunsérum; celui-ci, décanté, se montre désormais privé de ses propriétés spéciales. Mais les hématies ne fixent pas seulement la sensibilisatrice. Si, au lieu d'employer du sérum hémolytique chauffé, on met les hématies au contact de l'immunsérum frais, ces globules absorbent, ainsi que le montra Bordet[2], à la fois la sensibilisatrice et l'alexine dont elles dépouillent entièrement le liquide ambiant. Ce même phénomène de l'absorption de l'alexine se produit encore, bien entendu, si on introduit les globules non pas dans le sérum hémolytique frais, mais dans un mélange du sérum hémolytique préalablement chauffé à 55° et d'un sérum frais d'animal neuf; en effet (c'est là l'expérience de Bordet que nous rappelions au début) on sait qu'un immunsérum chauffé est complètement régénéré par l'addition de sérum normal frais : il redevient identique à ce qu'il était avant le chauffage. Mais comment décèlera-t-on l'absorption de l'alexine dans ce mélange de globules, d'alexine et de sensibilisatrice appropriée? D'une manière bien simple : en y ajoutant ultérieurement de nouveaux éléments sensibilisés, tels que des vibrions cholériques impressionnés par du cholérasérum chauffé à 55°. Si le mélange contenait encore de l'alexine, les vibrions sensibilisés qu'on y introduit s'y transformeraient sûrement en granules. Or ils y restent intacts, montrant ainsi que l'alexine a disparu du liquide. On peut aussi faire cette expérience inversement, en mélangeant à l'alexine d'abord le vibrion et le cholérasérum, ensuite les globules sensibilisés : ce sont alors les vibrions qui sont détruits et qui absordent l'alexine, et ce sont cette fois les globules, introduits ultérieurement, qui restent intacts.

De ces expériences, Bordet tira la conclusion que l'alexine qui se fixe sur les hématies sensibilisées et les détruit est identique à celle que les microbes sensibilisés absorbent en subissant son influence nocive. Dans un même sérum, il n'y aurait

1. Ehrlich et Morgenroth, *Berlin. Klin. Wochenschr.*, 1899, n° 1.
2. *Ces Annales*, mai 1900.

qu'une alexine, s'attaquant indifféremment soit aux microbes, soit aux globules. Que l'on donne raison à cet observateur en admettant comme lui l'unicité de l'alexine ou tout au moins l'unicité fonctionnelle de cette substance, ou bien qu'on se rallie à la thèse d'Ehrlich et Morgenroth, à savoir qu'un sérum normal contient un grand nombre d'alexines diverses, respectivement adaptées à tel ou tel élément cellulaire ou microbien qu'on désire soumettre à l'action de ce sérum, — le fait incontestable est qu'en présence de la sensibilisatrice appropriée, un élément microbien ou cellulaire quelconque prive complètement de son alexine le sérum frais, et le rend ainsi inactif pour de nouveaux éléments sensibilisés identiques ou très différents.

Il est à peine besoin de dire que dans les expériences dont il est question, et dans lesquelles le sérum neuf employé (alexine) provenait généralement du cobaye ou du lapin, on ne constatait pas l'absorption de l'alexine lorsque les éléments, les globules par exemple, n'étaient pas sensibilisés par l'immunsérum spécifique. En d'autres termes, si, au lieu du mélange : alexine, globules, sérum hémolytique (chauffé à 55°), on préparait une mixture analogue, mais où le sérum hémolytique était remplacé par du sérum (également chauffé à 55°) d'animal neuf de même espèce, le liquide restait chargé d'alexine, et ne perdait point, en conséquence, son pouvoir destructif vis-à-vis de nouveaux éléments sensibilisés. Les sérums normaux sont donc, en règle générale, impuissants à provoquer l'absortion de l'alexine.

S'ils contiennent des sensibilisatrices, ces matières sont trop peu abondantes, ou bien leur activité est trop faible pour que la fixation de l'alexine puisse s'effectuer d'une manière constatable par le procédé ci-dessus mentionné.

Cette règle générale souffre cependant, disons-le en passant, quelques exceptions. Il existe des sérums normaux dont l'alexine se fixe avec une très grande énergie sur *certains* éléments figurés, sans le secours d'aucun immunsérum. M. Malvoz, tout récemment [1], a montré que tel est le cas pour le sérum de chien neuf mis en présence du bacille charbonneux ; en outre, ce sérum peut même provoquer la fixation, par ce microbe, d'alexines d'espèces animales différentes (lapin, cobaye, rat) ; il se comporte donc comme s'il contenait une véritable sensibilisatrice.

1. Ces *Annales*, août 1902.

Dans le même ordre d'idées, M. Bordet et nous-même avons vu récemment que si l'on mélange à du sérum frais de chien neuf des globules de lapin (préalablement lavés), l'hémolyse se produit très activement et la fixation d'alexine s'opère avec une telle énergie que le sérum perd ses propriétés bactériolytiques ; on peut, ultérieurement, introduire dans le mélange des vibrions cholériques sensibilisés (par du choléra sérum chauffé à 55°) sans que ceux-ci subissent la transformation granuleuse.

Mais, nous le répétons, de pareils cas sont rares. Le sérum neuf de la plupart des animaux employés au laboratoire n'impressionne pas suffisamment les éléments figurés pour leur faire absorber l'alexine avec une réelle énergie ; les immunsérums de ces animaux, au contraire, rendent ces éléménts très avides de cette matière. La réaction de fixation de l'alexine permet donc, en général, de distinguer facilement le sérum d'un animal vacciné contre un élément connu, d'avec le sérum d'un animal de même espèce, mais non immunisé. Elle permet, en d'autres termes, de reconnaître la présence des sensibilisatrices spécifiques crées par la vaccination.

Une sensibilisatrice, avant les expériences de Bordet sur l'absorption de l'alexine, ne pouvait se définir que comme suit : c'était une substance rendant un élément déterminé (globule, vibrion) destructible, ou tout au moins morphologiquement altérable, par une dose d'alexine normalement incapable de l'attaquer. Mais puisque la propriété que possède la sensibilisatrice de multiplier l'action nocive de l'alexine n'est pas la seule dont cette substance est douée, puisqu'elle a en outre le pouvoir de faire absorber l'alexine par l'élément qu'elle a impressionné, il n'est plus du tout nécessaire, pour pouvoir affirmer l'existence d'une sensibilisatrice dans le sérum d'un organisme immunisé, de constater que l'élément, soit microbien, soit cellulaire, contre lequel l'animal a été vacciné. subit en présence de l'alexine et de l'immunsérum une altération morphologique bien visible. Il suffit que, dans ces conditions, l'alexine disparaisse du mélange. C'est ce principe qui a permis à Bordet et Gengou[1] de constater la présence de sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens, tels que ceux d'animaux injectés de peste, de rouget du porc, de premier vaccin charbonneux, de bacilles d'Éberth, de *proteus vulga-*

1. Bordet et Gengou, ces *Annales*, mai 1901.

ris, ainsi que dans le sérum de convalescents de fièvre typhoïde. Si on met, par exemple, dans 2 tubes, une même dose d'émulsion de bacilles pesteux dans l'eau physiologique et une même quantité d'alexine, puis qu'on ajoute au premier une dose déterminée de sérum de cheval neuf chauffé à 55° et dans le second la même quantité de sérum, chauffé à 55°, d'un cheval vacciné contre la peste, on constate que des globules de lapin bien sensibilisés, mis ultérieurement dans ces tubes, s'hémolysent parfaitement dans le premier et restent complètement intacts dans le second. Donc, l'alexine est restée libre dans le premier tube et a disparu dans le second; des mélanges témoins montrent, bien entendu, que ce sont bien les bacilles pesteux qui, influencés par le sérum préventif, ont fixé l'alexine.

Ces faits n'ont pas été contestés, que nous sachions tout au moins ; cependant, M. Aschoff[1] vient récemment de critiquer la méthode employée par Bordet et Gengou, prétendant que la production de l'hémolyse ne permet pas de conclure à l'absence de sensibilisatrice (dans le sérum neuf probablement); car, dit il, « à côté des alexines adéquates aux amboceptors bactéricides, il peut y avoir des alexines adéquates aux amboceptors hémolytiques ». Là n'est pas la question, car Bordet et Gengou n'ont pas cherché à établir qu'il n'y avait pas de sensibilisatrice dans le sérum neuf, mais ils ont établi qu'il y en a une dans les immunsérums. Au surplus, si M. Aschoff croit à l'existence de sensibilisatrice antipesteuse dans le sérum neuf de cheval, *comme* dans le sérum antipesteux, comment explique-t-il que le second fixe « ces alexines hémolytiques » sur le bacille pesteux, et que le premier n'en fasse pas autant?

Il résulte de cet exposé que, jusqu'à présent, *les sensibilisatrices n'ont été décelées et étudiées que dans les sérums qui agissent sur des éléments morphologiques organisés* (microbes, cellules diverses). Il semble que l'on puisse aller plus loin et se poser la question suivante : Un élément *doit-il être nécessairement organisé*, morphologiquement descriptible, pour que son injection à un animal *donne lieu à la production de sensibilisatrices adéquates?* On a déjà bien des fois injecté des substances dépourvues de toute structure cellulaire. Bordet[2], par exemple, vaccina autrefois des

1. Aschoff, Ehrlich's Leitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstlichen Immuniätsprozesse, *Zeitschr. f. allgem. Physiol.*, 1902, 3ᵉ Hft, 1 ter Bd, p. 159.
2. Bordet, Mécanisme de l'agglutination, ces *Annales*, mars 1899.

lapins contre du lait de vache et obtint un sérum précipitant ce lait. Wassermann[1] montra qu'on peut arriver au même résultat avec diverses espèces de lait. Tchistovitch[2], Bordet[3] injectèrent des sérums d'animaux à des espèces différentes, et ceux-ci fournirent un sérum précipitant les premiers. Mijers[4] obtint aussi des sérums précipitant l'albumine du blanc d'œuf, la globuline du sang de mouton et de bœuf, la peptone. Depuis, ces injections ont été faites par de nombreux auteurs, dont la liste allongerait inutilement cet exposé.

Mais l'on n'a signalé jusqu'ici que ce pouvoir précipitant dans le sérum des animaux injectés de matières organiques non cellulaires, provenant d'autres espèces animales. Il nous a paru désirable de rechercher si l'organisme se bornait là au cours de ces injections, et s'il ne produisait pas, ici également, des substances de même ordre que les sensibilisatrices antimicrobiennes et hémolytiques. Nous avons employé dans ce but la méthode suivie par Bordet et Gengou, basée, comme nous l'avons dit plus haut, sur la fixation par un élément sensibilisé quelconque de toute l'alexine qu'il rencontre. Nous avons recherché si cette fixation peut se produire sous l'influence du sérum de lapins injectés de liquide tels que du lait de vache, du blanc d'œuf de poule, du fibrinogène pur de cheval, du sérum de chien chauffé à 55°, — ou bien encore sous l'influence du sérum de cobayes injectés de sérum de lapin chauffé à 55°; nous avons recherché, en d'autres termes, si ces sérums d'animaux traités contiennent, outre une précipitine, une sensibilisatrice pour les substances qui ont été injectées.

Sérum de lapins vaccinés contre le lait de vache. — Nous avons injecté à ces lapins des doses relativement considérables de lait de vache, chauffé au préalable à 70° pendant une 1/2 heure. Ils reçoivent successivement 10 c. c., 10 c. c., 12 c. c., 12 c. c. de lait à 7 jours d'intervalle. Leur sérum, recueilli 14 jours après la dernière injection, est chauffé une 1/2 heure à 56°; nous le désignerons sous le nom de sérum lapin-lait 56°. Comme alexine,

1. Wassermann, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1899, n° 80.
2. Tchistovitch, ces *Annales*, mars 1899.
3. Bordet, ces *Annales*, mars 1899.
4. Mijers, *Centralbl. für Bakter.*, 1900, Bd. XXVII.

nous nous sommes toujours servi du sérum d'un lapin neuf, préparé la veille, dépouillé de globules par centrifugation et maintenu à la température du laboratoire (16° C.).

On prépare avec ces réactifs les mélanges suivants :

Le 1er tube contient : 2/10 de c. c. de lait de vache;
6/10 de c. c. de sérum lapin-lait 56°;
1/10 de c. c. de l'alexine de lapin ;
Le 2e tube contient : 2/10 de c. c. de lait de vache ;
6/10 de c. c. de sérum de lapin neuf 56°;
1/10 de c. c. d'alexine de lapin ;
Le 3e tube contient : 2/10 de c. c. d'eau physiologique à 7,5 0/00;
6/10 de c. c. de sérum lapin-lait 56 ;
1/10 de c. c. d'alexine de lapin;
Le 4e tube contient : 2/10 de c. c. d'eau physiologique à 7,5 0/00;
6/10 de c. c. de sérum de lapin neuf 56°;
1/10 de c. c. d'alexine de lapin;
Le 5e tube contient : 2/10 de c. c. de lait de vache ;
6/10 de c. c. de sérum lapin-lait 56°;
1/10 d'eau physiologique ;
Le 6e tube contient : 2/10 de lait de vache ;
6/10 de sérum de lapin neuf à 56° ;
1/10 d'eau physiologique.

Tubes 1 et 2. — C'est dans ces tubes que l'on compare réellement l'action sur le lait du sérum lapin-lait 56° à celle du sérum de lapin neuf 56°.

Tubes 3 et 4. — Ces tubes sont destinés à établir l'action du sérum lapin-lait 56° et du sérum de lapin-neuf 56°, sur le sérum alexique, en l'absence de lait.

Tubes 5 et 6. — Ne contenant pas d'alexine, ces tubes servent à constater que les sérums lapins-lait 56° et lapin neuf 56° n'hémolysent pas, en l'absence d'alexine, et permettent d'observer, par comparaison, l'état de l'hémolyse dans les quatre premiers tubes.

Le tout est laissé 5 heures à la température du laboratoire, et agité de temps à autre, pour assurer le mélange intime des divers constituants. On introduit alors dans chacun des tubes, 1/30 de c. c. de globules de poule sensibilisés[1]. Voici ce

1. Du sang défibriné de poule est lavé dans une grande quantité d'eau salée à 7,5 0/00; les globules sont remis en suspension dans un volume d'eau salée égal à celui du sang défibriné d'où on les a obtenus. Ainsi privés de sérum sanguin de poule, ils sont sensibilisés par l'addition de 2 volumes de sérum chauffé à 56°, provenant d'un lapin injecté à plusieurs reprises de globules de poule.

que l'on constate, 2 heures environ après l'introduction de ces globules dans les tubes; le résultat se maintient, même le lendemain :

Dans les tubes 2, 3 et 4, l'hémolyse se fait complètement et pour ainsi dire dans le même temps; visible après 30 minutes, elle est complète 1 heure et demie environ après l'introduction des globules sensibilisés. Les tubes 1, 5 et 6, au contraire, ne montrent aucune hémolyse, même après 24 heures de contact. Que faut-il conclure de là? Dans les tubes 5 et 6, il n'y a pas d'hémolyse, parce qu'il n'y a pas d'alexine; dans les tubes 3 et 4, l'alexine est restée libre en présence du sérum de lapin-lait 56° et du sérum de lapin neuf 56°; il en est de même dans le tube 2 où l'alexine n'a pas été fixée par le lait. Quand au tube 1, il s'est comporté comme les tubes 5 et 6, comme s'il ne contenait pas d'alexine. Celle que nous y avions mise n'a pu être fixée par le sérum de lapin-lait 56° seul (voir tube 3), et n'aurait pu l'être par le lait (voir tube 2), si celui-ci n'avait subi, de par l'action du sérum lapin-actif-lait 56°, une mo[illegible]cation identique à celle que subissent, dans les expériences de Bordet, de Bordet et Gengou, les microbes divers ou les globules sensibilisés par les immunsérums appropriés. Nous pouvons donc admettre que le sérum de lapins injectés de lait de vache contient, outre la précipitine, une sensibilisatrice qui, comme celles qui existent dans les sérums antimicrobiens et hémolytiques, confère au lait de vache le pouvoir de fixer l'alexine des sérums normaux.

Sérum de lapins injectés de blanc d'œuf de poule. — Ces lapins ont reçu également de fortes doses de blanc d'œuf; nous leur avons injecté successivement 10 c. c., 10 c. c., 12 c. c., 10 c. c. de blanc d'œuf, à 7 jours d'intervalle, la dernière inoculation étant suivie, après 14 jours, de la prise de sang. Le sérum — que nous appellerons sérum lapin-œuf 56° — est chauffé à 56° pendant 30 minutes. L'alexine est encore du sérum d'un lapin neuf saigné la veille, et privé de ses globules par centrifugation.

On établit avec ces sérums la même expérience que pour l'étude du sérum lapin-lait 56°; le blanc d'œuf est naturellement partout substitué au lait de vache et le sérum lapin-œuf 56° remplace le sérum lapin-lait 56°.

Les résultats de cette expérience sont absolument identiques à ceux que nous avons décrits à propos du sérum lapin-lait 56°.

Ici aussi, sous l'influence du sérum lapin-œuf 56°, l'alexine est fixée par le blanc d'œuf de poule, tandis que cette fixation n'a pas lieu en présence de sérum de lapin neuf chauffé à 56° (tube 2) ou en l'absence d'œuf de poule (tubes 3 et 4).

Notons aussi que nos sérums lapin-œuf 56° déterminent dans le blanc d'œuf un abondant précipité, que n'y produit pas le sérum de lapin neuf 56°.

Sérums de lapins injectés de sérum de chien chauffé à 56°. — Ce sérum, sérum lapin-actif-chien 56°, fut obtenu comme les sérums lapin-lait 56° et lapin-œuf 56°. Les injections de sérum de chien, préalablement chauffé à 56°, respectivement de 8 c. c., 10 et 12 c. c., furent faites à 1 semaine d'intervalle. La saignée des lapins vaccinés eut lieu 2 semaines après la dernière inoculation et le sérum obtenu fut porté pendant 30 minutes à 56°.

Les expériences que ce sérum lapin-actif-chien servit à réaliser sont calquées sur les précédentes, et l'on fait, outre les mélanges importants, la série habituelle des témoins accessoires, sur lesquels nous n'insistons plus. Les mélanges importants sont évidemment ceux où l'on met en présence :

a) de l'alexine de lapin (1/10 de c. c.), du sérum lapin-actif-chien, préalablement chauffé à 56° (6/10 de c. c.), du sérum de chien chauffé à 56° (2/10 de c. c.);

b) mélange constitué des mêmes doses des mêmes éléments, sauf que le sérum lapin-actif-chien est remplacé par une quantité équivalente de sérum de lapin neuf chauffé à 56°.

On laisse, comme d'habitude, les mélanges 5 heures à la température du laboratoire ; puis on ajoute à chaque tube 1/30 de c. c. de globules de poule sensibilisés.

Les résultats sont entièrement conformes à ceux qui ont été consignés plus haut. Les globules sont détruits par l'alexine dans *b*; dans *a*, au contraire, l'hémolyse n'apparaît pas. Le sérum lapin-actif-chien a donc fixé sur le sérum de chien l'alexine de lapin; à côté de la précipitine de Tchistovitch, il contient donc une sensibilisatrice comme le sérum lapin-lait et le sérum lapin-œuf.

Sérum de cobayes injectés de sérum de lapin chauffé à 56°. — Nous nous sommes proposé d'étudier cet exemple, car il est

assez particulier. On sait, en effet, d'après les recherches de Bordet, que, contrairement à la règle générale, les cobayes injectés de sérum de lapin ne produisent pas de précipitine active vis-à-vis du lapin. On pouvait tout d'abord se demander, en présence de ce résultat exceptionnel, si l'on n'arriverait pas à obtenir, même dans cet exemple, un sérum précipitant, en pratiquant non pas 2 injections de sérum, comme cela suffit dans les cas étudiés jusqu'ici, mais des injections de sérum de lapin plus fréquemment répétées. Nous avons donc pratiqué à des cobayes, 6 injections successives de 4 à 5 c. c. de sérum de lapin. Nous sommes arrivés ainsi à obtenir un sérum qui, à la vérité, ne provoquait pas de précipité dans le sérum de lapin, mais qui y faisait naître une opalescence nettement visible.

Comme le faisaient donc prévoir les résultats obtenus par nos prédécesseurs, le cobaye n'élabore que des précipitines peu énergiques à l'égard du sérum de lapin. Nous avons recherché si la propriété sensibilisatrice pouvait être décelée dans un pareil sérum « cobaye-actif-lapin ». Ici encore, nous avons constaté la fixation de l'alexine du cobaye sur le sérum de lapin 56°, sous l'influence du sérum de cobaye-actif-lapin; toutefois, cette fixation nous a paru moins énergique que les précédentes, car nous n'avons pas constaté une absence d'hémolyse, mais un simple retard, notable il est vrai, sur l'hémolyse normale. Nous pensons donc que dans l'exemple du sérum cobaye-actif-lapin, on peut admettre l'existence de la propriété sensibilisatrice, mais que celle-ci, de même que la propriété précipitante, est relativement peu énergique.

Sérum de lapin injectés de fibrinogène pur de cheval. — En injectant du fibrinogène pur à des lapins, nous avons voulu rechercher s'il nous serait possible, comme on l'a fait à maintes reprises pour la coaguline des globulines, de la caséine, etc., de provoquer la production de sensibilisatrices vis-à-vis d'une substance chimiquement pure. Nous avons employé, pour obtenir le fibrinogène de cheval, la méthode de Hammarsten [1].

1. Du plasma de cheval, oxalaté à 1 0/00, centrifugé, est additionné de son volume d'une solution de chlorure sodique à 30 0/0. Le précipité formé est redissous dans du chlorure sodique à 8 0/0, puis précipité à nouveau par du NaCl à 30 0/0; après 3 ou 4 précipitations succcessives, le fibrinogène est redissous dans de l'eau distillée stérile, dissolution facile grâce au chlorure sodique

Nos lapins ont reçu, à 7 jours d'intervalle, successivement 10 c. c., 12 c. c., 12 c. c. et 15 c. c. de notre solution; on les a saignés 2 semaines après la dernière injection. Leur sérum, que nous appellerons sérum lapin-fibrinogène 56°, est, après chauffage, expérimenté sur une solution de fibrinogène, dont nous avions, comme il a été dit plus haut, contrôlé la pureté. Il y provoque immédiatement un précipité très abondant, qui ne se produit pas sous l'action du sérum de lapin neuf 56°. De plus, en appliquant à cet exemple notre technique habituelle, maintes fois signalée dans les pages qui précèdent, nous avons constaté que le sérum lapin-fibrinogène provoque la fixation, par le fibrinogène pur de cheval, de l'alexine de lapin. Cela revient à dire que *cet immunsérum possède une sensibilisatrice active sur le fibrinogène.*

Il résulte des faits que nous venons d'exposer que le lapin, quand on lui injecte des substances telles que du lait, du blanc d'œuf, du fibrinogène, du sérum d'espèces différentes, fabrique et des précipitines *et des sensibilisatrices actives sur ces diverses matières. Ainsi donc, la production de sensibilisatrices par un organisme n'est pas nécessairement liée à la morphologie de l'élément injecté; l'organisme fait contre des substances dépourvues de structure cellulaire ce qu'il fait contre des éléments histologiquement définis.*

De même que les sensibilisatrices des sérums antimicrobiens et hémolytiques *fixent l'alexine des sérums normaux frais sur les microbes ou les globules* qui ont été injectés aux animaux, de même les *sensibilisatrices des sérums non anticellulaires fixent cette alexine sur les substances* qui ont amené leur fabrication.

*
* *

Parmi les immunsérums que nous avons obtenus, la plupart agissent sur des mélanges complexes, tels que le sérum, le lait et l'œuf. On peut se demander si la sensibilisatrice porte son action sur l'ensemble des substances qui constituent ces mélanges

entraîné par le fibrinogène dans sa précipitation. Pour nous assurer de sa pureté, nous l'avons additionné d'une part de chlorure calcique, d'autre part de sérum sanguin frais. Le second nous a donné une coagulation, ce qui prouve que nous avions bien du fibrinogène en solution; le premier n'en a pas produit, ce qui démontre que le proferment était absent de notre solution. Nous nous sommes assuré en outre, par l'action de la chaleur, qu'elle ne contenait pas d'autres albumines ou globulines.

ou plus spécialement sur l'une ou l'autre d'entre elles.

Cette recherche a été faite pour la coaguline par divers auteurs, qui sont du reste arrivés à des résultats quelque peu différents. On peut considérer comme admis, nous semble-t-il, que la coaguline agit parfaitement sur les globulines (Nolf[1], Mijers[2], F. Hamburger[3], Van Steenberghe[4], Leblanc[5]). Mais il est difficile de se rendre compte de son action sur les albumines; F. Hamburger prétend en effet avoir une coaguline pour la lactalbumine, Mijers pour l'albumine de l'œuf et Leblanc pour l'albumine du sérum; au contraire, Nolf n'a pas obtenu d'action sur la séralbumine.

Nous avons entrepris quelques expériences à ce sujet, en nous bornant toutefois à rechercher l'action du sérum de lapin-actif-chien et du sérum de lapin-actif-lait sur les éléments isolés du sérum de chien et du lait.

Action du sérum de lapin-actif-chien sur les globulines et l'albumine du sérum de chien. — Nous avons isolé les globulines du sérum de chien par la saturation au moyen de sulfate magnésien. Après redissolution dans l'eau distillée, elles sont précipitées à nouveau par la saturation au moyen du chlorure sodique; cette précipitation est répétée encore deux fois, et les globulines sont finalement remises en solution dans un volume d'eau distillée identique au volume du sérum initial. La dissolution y est assurée par le NaCl entraîné par les globulines.

L'albumine est obtenue, par l'acide acétique, du liquide magnésien, dépouillé de ses globulines, puis est remise en solution dans l'eau physiologique; on neutralise la liqueur par quelques gouttes de soude à 2 0/0, de façon à la ramener à la neutralité au papier de tournesol.

On établit ensuite avec ces deux produits, deux séries de tubes dans lesquels on fait agir, sur chacun d'eux, du sérum de lapin neuf 56° et du sérum de lapin-chien 56°, en présence et en l'absence d'alexine de lapin. En l'absence d'alexine, les globules de poules sensibilisés, mis après 5 heures, restent intacts; les solutions de globulines et d'albumine que nous

1. Nolf, ces *Annales*, 1900.
2. Mijers, *loc. cit.*
3. F. Hamburger, *Wien. klin. Wochenschr.*, 1901, p. 1202.
4. Van Steenbergh, ces *Annales*, 1901.
5. Leblanc, *La Cellule*, t. XVIII, 2e fascic.

avons employées n'étaient donc pas hémolytiques par elles-mêmes. En présence de sérum de lapin neuf 56°, l'alexine hémolyse très bien les hématies sensibilisées; au contraire, ce fait manque en présence du sérum de lapin-chien.

Il semble donc, d'après cette expérience, que le sérum de lapin-chien fixe l'alexine de lapin tout aussi bien sur les globulines que sur l'albumine du sérum de chien. Nous n'attribuons toutefois qu'une signification limitée à cet essai, que nous n'avons pu répéter, faute de matériel.

Action du sérum lapin-lait sur la caséine, la lactoglobuline et la lactalbumine du lait de vache. Il n'en est pas de même des expériences que nous avons entreprises avec les divers éléments du lait. et que nous avons exécutées à maintes reprises, toujours avec le même résultat.

Nous nous sommes procuré la caséine du lait par le procédé bien connu consistant à diluer d'abord le lait dans trois fois son volume d'eau et à précipiter la caséine par 1 à 2 0/00 d'acide acétique. Le précipité est redissous dans de l'ammoniaque à 1 p. 200, puis précipité à nouveau deux fois par l'acide acétique.

La caséine, ainsi purifiée, est dissoute dans un volume d'eau ammoniacale égal à celui du lait dont on est parti; on neutralise ensuite par l'acide phosphorique.

La lactoglobuline et la lactalbumine furent obtenues du petit lait par la même méthode que celle qui nous a servi à préparer les globulines et l'albumine du sérum de chien. Elles ont toujours été redissoutes, en dernier lieu, dans un volume de liquide de beaucoup inférieur à celui du petit-lait qui les avait fournies. Nous savons, en effet, par les recherches de Bordet, que pour fixer sur des microbes toute l'alexine d'un sérum frais, sous l'influence du sérum actif correspondant, il faut que ces microbes soient en nombre considérable. Or, la lactoglobuline et la lactalbumine sont en trop petite quantité dans le lait pour que, en l'absence de la caséine qui entre pour une forte part dans les matières organiques du lait, elles puissent éventuellement assurer à elles seules la fixation de toute l'alexine sous l'influence du sérum de lapin-lait. C'est pourquoi nous avons toujours redissous ces substances dans un volume de

liquide, cinq fois plus petit que celui du petit lait d'où nous les avions obtenues.

Ces substances ainsi préparées servent à établir trois séries de tubes absolument identiques, chacune d'elles étant semblable à l'expérience que nous avons décrite à propos du sérum lapin-lait 56°. A côté d'une 4e série où l'on répète exactement la fixation de l'alexine de lapin par le lait sous l'influence de sérum de lapin-lait, on fait donc trois séries, où le lait est successivement remplacé par la caséine, la lactoglobuline et la lactalbumine.

Dans les tubes des quatre séries, qui contiennent respectivement le lait, la caséine, la lactoglobuline et la lactalbumine, et du sérum de lapin neuf 56°, l'hémolyse se fait parfaitement; l'alexine n'a donc pas été fixée par ces éléments en l'absence de sérum lapin-lait. Mais là où ces divers éléments sont soumis à l'action du sérum actif, on ne trouve d'hémolyse qu'en présence de lactalbumine, au contraire, elle fait totalement défaut en présence de caséine ou de lactoglobuline, tout aussi bien que de lait. L'alexine est donc fixée par le sérum lapin-lait, et sur la caséine et sur la lactoglobuline; au contraire, elle ne nous a pas paru absorbée par la lactalbumine. Nous ajouterons que *le pouvoir précipitant de nos sérums a marché complètement de pair avec le pouvoir sensibilisant; nous avons en effet observé, sous l'influence du sérum lapin-actif lait, un précipité très net dans la caséine et dans la lactoglobuline, tandis que la solution de lactalbumine est restée absolument limpide.* Nous ne nous sommes donc pas rencontré à ce propos avec F. Hamburger.

*
* *

Une des principales propriétés des sensibilisatrices des sérums antimicrobiens et hémolytiques est d'être spécifiques. En très grande majorité, en effet, les immunsérums ne sont actifs qu'à l'égard des éléments cellulaires dont l'injection a provoqué leur apparition. On ne connaît guère, pensons-nous, d'exception à cette règle; toutefois Ehrlich et Morgenroth ont observé que le sérum de lapins injectés de sang de bœuf sensibilise non seulement les hématies du bœuf, mais aussi celles de la chèvre.

Au contraire, nombreuses sont les exceptions à la règle de la spécificité, dans le domaine des coagulines. Wassermann et

Schütze[1], Stern[2], Nuttall[3] notamment, ont montré que du sérum d'animaux injectés de sérum humain précipite non seulement ce dernier, mais aussi celui des grands singes, Grünbaum[4] obtint, en injectant le sérum de trois espèces de singes, trois sérums agissant sur chacun des trois premiers et aussi sur celui de l'homme. Linossier et Lemoine[5] observèrent que du sérum d'animaux injectés de sérum de bœuf peut précipiter celui d'autres espèces animales. Enfin, Moro[6] a montré récemment que du sérum précipitant le lait de vache agit aussi bien sur celui de chèvre.

Nous avons cru bon de rechercher jusqu'à quel point nos sérums actifs contre des substances albuminoïdes présentent, notamment au point de vue de la propriété sensibilisatrice, le caractère de la spécificité.

Sérum lapin-actif-lait. — Ce sérum, préalablement chauffé à 56°, et qui provient de lapins injectés de lait de vache, fut mis en contact avec du divers laits : lait de vache, de brebis, de chèvre, de jument et de femme.

Pour chacun de ces laits, on opère dans 2 tubes les mélanges suivants, où l'on compare l'action qu'ont sur eux du sérum de lapin neuf 56° et du sérum actif :

1er tube : 2/10 de c. c. de lait (de vache, par exemple) ;
6/10 de c. c. de sérum lapin-lait 56° ;
1/10 de c. c. de sérum alexique de lapin.
2e tube : 2/10 de c. c. de lait de vache ;
6/10 de c. c. de sérum de lapin neuf 56 ;
1/10 de c. c. d'alexine de lapin.

La série se continue par des tubes identiques, où l'espèce de lait seule varie.

A côté de cette série en furent instituées d'autres, contenant (les quantités de lait et d'alexine de lapin restant toujours les mêmes) des doses de moins en moins fortes de sérum actif et de sérum de lapin neuf chauffé : 4/10, 2/10 et 1/10 de c. c.

1. Wassermann et Schutze.
2. Stern, *Deutsche med. Woch.*, 1901, p. 135.
3. Nuttal, *The Journ. of Hyg.*, vol. Juli 1901, n° 3.
4. Grunbaum, *The Lancet*, Jan. 18, 1902.
5. Linossier et Lemoine, *Comptes rendus de la Soc. de biol.*, 1902, p. 85.
6. Moro, *Wiener Klin. Wochenschr.*, 1902, p. 121.

Nulle part évidemment, le sérum de lapin neuf 56° ne fixa l'alexine sur ces divers laits; partout, au contraire, en présence de sérum lapin-lait 56°, l'absorption de l'alexine eut lieu. La spécificité du sérum lapin-lait est nulle quand on fait agir 6/10 de c. c. de ce sérum et 1/10 de c. c. d'alexine de lapin sur 2/10 de c. c. de lait de vache, de brebis, etc. Si on diminue les doses de sérum actif, même à 1/10 de c. c., on ne constate aucune différence dans son action sur les laits de vache, de brebis et de chèvre. Le lait de femme, au contraire, fut moins sensibilisé par nos sérums lapin-lait; même à la dose de 6/10 de c. c. de ces sérums pour 2/10 de c. c. de lait, la fixation de l'alexine, quoique presque totale, est néanmoins imparfaite et on peut dire qu'elle est presque nulle quand on n'emploie que 2/10 de c. c. au lieu de 6/10 de c. c. de sérum actif.

Le lait de jument vient s'intercaler entre les laits du premier groupe et le lait de femme; totale, quand on emploie 6/10, 4/10 ou même 2/10 de c. c. de sérum actif, la fixation n'est plus complète quand celui-ci est réduit à la dose de 1/10 de c. c.

En résumé, *la sensibilisatrice qui existe dans nos sérums de lapins traités par le lait de vache n'est guère spécifique. Elle agit très énergiquement sur certains laits provenant d'espèces animales différentes (vache, brebis, chèvre), un peu moins nettement sur d'autres (laits de femme et de jument).*

Sérum lapin-œuf 56°. — Les mêmes expériences furent faites pour la sensibilisatrice du sérum lapin-œuf. Obtenu par des injections de blanc d'œuf de poule, ce sérum fut mis en contact avec du blanc d'œuf de poule, de pigeon, de dinde et de cane. Dans nos premières recherches, nous avons toujours fait agir sur 2/10 de c. c. du blanc de ces divers œufs, 6/10 de c. c. de sérum actif; chez tous, ce sérum a produit un précipité intense, et chez tous aussi il a fixé l'alexine de lapin sur le blanc d'œuf, de telle sorte que l'hémolyse des globules de poule sensibilisés n'eut plus lieu ultérieurement. L'hémolyse se produit, au contraire, très bien partout quand on remplace le sérum actif par du sérum d'un lapin neuf, chauffé à 56°.

Nous n'avons pu établir avec ces diverses espèces d'œufs une expérience à doses étagées, comme nous l'avions fait pour le sérum lapin-lait; elle fut possible cependant avec l'œuf de poule et de pigeon. Chez ces deux espèces, la fixation de 1/10 de c. c.

d'alexine de lapin sur 2/10 de c. c. de blanc d'œuf se fait très bien quand on sensibilise ce dernier par 6/10, ou même 5/10 de c. c. de sérum actif. Avec 4/10 de c. c., elle est presque totale, et elle devient très faible avec 2/10 de c. c. de ce sérum. Ces deux espèces de blanc d'œuf n'ont donc pas montré de différence dans la fixation de l'alexine, sous l'influence de la sensibilisation par des quantités variables de sérum d'un lapin injecté de blanc d'œuf de poule.

En somme, nous *n'avons pas constaté de spécificité ni de la sensibilisatrice, ni de la précipitine de nos sérums lapin-œuf.*

Sérum lapin fibrinogène 56°. — Pas plus que dans les deux précédents, nous n'avons observé de spécificité dans l'action précipitante et sensibilisante du sérum lapin-fibrinogène. Ce sérum, que nous avions obtenu par des injections massives de fibrinogène pur de cheval, fut mis en contact avec deux autres échantillons de fibrinogène, l'un de bœuf, l'autre de chien, les trois fibrinogènes ayant été préparés exactement de la même façon. Tous trois, sous l'action du sérum lapin-fibrinogène, ont précipité abondamment et instantanément; nous n'avons pu voir de ce côté aucune différence entre eux, même quand nous avons réduit à 1/10 de c. c. la dose de sérum actif mise en contact avec 2/10 de c. c. de fibrinogène, en présence de 1/10 de c. c. d'alexine de lapin.

De même, la sensibilisatrice de ce sérum agit sur ces trois fibrinogènes. Quelle que soit la dose de sérum actif employée (3, 2, 1 ou 1/2 volume pour 1 volume de solution de fibrinogène et 1/2 volume d'alexine de lapin), la fixation de l'alexine sur chaque fibrinogène s'est produite: complète pour tous avec les doses fortes de sérum actif, elle a été de moins en moins totale avec les quantités plus faibles.

Sérum lapin-actif-chien 56°. — Étant donnée l'importance, au point de vue pratique, des phénomènes de précipitation des sérums dont Tchistovitch a donné le premier exemple, nous avons aussi recherché si la sensibilisatrice de nos sérums lapin-chien était spécifique.

Ces sérums furent mis en contact, à des doses variables (6/10, 4/10, 2/10 et 1/10 de c. c.), avec la même quantité (2/10 de c. c.) de divers sérums chauffés à 56° et de 1/10 de c. c. d'alexine de lapin.

Nous les avons fait agir de la sorte sur du sérum de chien, de cheval, de bœuf et de cobaye.

Avec les doses de 6/10 et 4/10 de c. c., le précipité obtenu dans le sérum de chien est très net; il le devient moins avec 2/10 et il n'est plus perceptible avec 1/10 de c. c. de sérum actif. Dans les autres sérums expérimentés, le trouble a, au contraire, toujours fait défaut. De même, l'alexine ne fut fixée que sur le sérum de chien, par 6/10 de c. c. de sérum lapin-chien; déjà moins complète en présence de 4/10 de c. c. de ce dernier, elle est nulle avec les doses moindres.

Mais le sérum actif, quelle que fût la dose mise en jeu, ne provoqua aucune fixation d'alexine par les autres sérums (cheval, bœuf, cobaye).

La spécificité de la sensibilisatrice a donc été, dans ce cas, aussi nette que celle de la précipitine, et nous semble bien comparable à celle des sérums antimicrobiens et hémolytiques.

*
* *

Il nous reste à relater quelques essais que nous avons faits, précisément guidé par l'absence de spécificité dont il a été question plus haut à propos de la plupart de nos sérums. Nous avons cherché si ces sérums étaient actifs uniquement sur les substances qui avaient servi aux injections, s'ils n'avaient aucune influence sur d'autres éléments des mêmes animaux. Nous ne faisons du reste, de la sorte, qu'ajouter quelques exemples de plus à d'autres signalés par divers auteurs. Leclainche et Vallé [1], Mertens [2], Dieudonné [3], Imelzer [4], Schütze [5] ont observé que des sérums antihumains (obtenus par l'injection de sang humain) pouvaient déterminer des précipités dans l'urine, les exsudats pleuraux; inversement on peut obtenir par l'injection d'exsudats ou de transsudats un sérum précipitant le sang humain. Schütze [6], en injectant de la poudre de muscle humain, obtint un sérum sensibilisant les hématies de l'homme.

1. Leclainche et Vallé, *La Sem. médic.*, 1901, n° 4,
2. Mertens, *Deutsche med. Woch.*, 1901, n° 11
3. Dieudonné, *Münch. med. Woch.*, 1901, n° 14.
4. Imelzer, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1901, p. 219.
5. Schutze, *Zeitschr, f. Hyg.* Bd. XXXVI, 1901, p. 459.
6. Schutze, *Ibid.*, Bd. XXXVIII, 1901, p. 487.

F. Hamburger[1] a montré que des sérums précipitant la lacto-globuline et la lactalbumine précipitent aussi le sang de bœuf.

Nous nous sommes demandé si le blanc d'œuf de poule ne pouvait pas être précipité et sensibilisé par d'autres sérums que nos sérums lapin-œuf 56°. Voici une expérience où nous avons cherché à constater l'influence, sur ce blanc d'œuf, d'un sérum de lapin injecté de sang défibriné de poule et très actif contre les globules de celle-ci.

1er tube : 2/10 de c. c. de blanc d'œuf de poule;
6/10 de c. c. de sérum de lapin injecté de globul. de poule 56°.
1/10 de c. c. d'alexine de lapin.
2e tube : 2/10 de c. c. de blanc d'œuf de poule;
6/10 de c. c. de sérum lapin-œuf 56°;
1/10 de c. c. d'alexine de lapin.
3e tube : 2/10 de c. c. de blanc d'œuf de poule;
6/10 de c. c. de sérum de lapin neuf 56°;
1/10 de c. c. d'alexine de lapin.

A tous trois, après 5 heures de contact, on ajoute 1/3, 1/10 de c. c. de globules de poule sensibilisés.

Dans les 2 premiers tubes apparaît rapidement un trouble intense, qui fait défaut dans le troisième. Dans les deux premiers aussi, la fixation de l'alexine est complète; dans le troisième, elle est nulle. *Le sérum d'un lapin injecté de sang défibriné de poule est donc capable de précipiter et de sensibiliser le blanc d'œuf de poule, tout comme du sérum lapin-œuf.*

L'inverse est-il aussi possible? C'est-à-dire, le sérum lapin-œuf est-il capable d'agglutiner et de sensibiliser des globules de poule? Cette expérience comporte les 3 tubes suivants :

1er tube : 1/10 de c. c. de globules de poule lavés, non sensibilisés;
3/10 de c. c. de sérum lapin-neuf 56°;
2/10 de c. c. d'alexine de lapin.
2e tube : 1/10 de c. c, de globules de poule lavés, non sensibilisés;
3/10 de c. c. de sérum lapin-œuf 56°;
2/10 de c. c. d'alexine de lapin.
3e tube : 1/10 de c. c. de globules de poule lavés, non sensibilisés;
3/10 de c. c. de sérum de lapin 56°, injecté de sang défibriné de poule;
2/10 de c. c. d'alexine de lapin.

1. F. Hamburger, *Wiener klin. Wochenschr.*, 1901, p. 1202.

L'hémolyse ne se fait pas du tout dans le premier tube, elle est au contraire rapide dans le troisième, dans le second elle a lieu, mais plus lentement que dans le dernier; dans ce second tube, il ne nous a pas paru y avoir d'agglutination des hématies.

Nous avons ensuite recherché si ce sérum lapin-œuf pouvait agir sur du sérum normal de poule; nous n'avons constaté aucune influence. Il en a été de même quand nous avons fait agir du sérum lapin-actif-lait sur du sérum sanguin de vache. En somme, on voit que lorsqu'on fait agir un immunsérum donné sur des éléments autres que ceux qui ont servi à l'immunisation, mais provenant de la même espèce animale, les résultats varient suivant les cas : on ne peut *a priori* prévoir ce que l'expérience donnera. Tandis que le sérum lapin-lait n'a aucune influence sur le sérum de vache, et le sérum lapin-œuf sur du sérum de poule, on constate que ce sérum lapin-œuf sensibilise jusqu'à un certain point des globules de poule, et que le sérum d'un lapin injecté de sang défibriné de poule est très actif vis-à-vis du blanc d'œuf de poule.

* * *

CONCLUSIONS

Les expériences que nous venons de rapporter nous permettent, croyons-nous, d'admettre :

1° Que dans les sérums que nous avons obtenus en injectant à des lapins des quantités assez fortes de lait de vache, de blanc d'œuf de poule, de fibrinogène pur de cheval et de sérum de chien chauffé à 56°, il existe, à côté des précipitines de Bordet et de Tchistovitch, des substances analogues aux sensibilisatrices que Bordet a décrites dans les sérums bactériolytiques et hémolytiques et qui ont été retrouvées dans la plupart des sérums antimicrobiens. Il en est de même dans le sérum de cobayes injectés de sérum de lapin, quoique, dans ce cas, la sensibilisatrice paraisse moins puissante.

2° Les sensibilisatrices que Bordet a étudiées provoquent la fixation de l'alexine par les cellules ou les microbes. Les sensibilisatrices que nous venons de décrire provoquent le même phénomène, mais elles sont actives vis-à-vis de matières inorganisées. Dans les cas qui nous occupent, ce sont des substances

chimiques sans structure, et non plus des éléments morphologiquement définis, qui absorbent l'alexine sous l'influence du sérum actif.

3° Dans le sérum de lapins injectés de sérum de chien, la sensibilisatrice *paraît* agir à la fois sur la globuline et l'albumine du sérum de chien; dans le sérum de lapins injectés de lait de vache, la sensibilisatrice porte son action sur la caséine, la lactoglobuline et non sur la lactalbumine.

4° On sait que les sensibilisatrices des sérums antimicrobiens et hémolytiques présentent en général d'une manière très stricte le caractère de spécificité. Nous avons retrouvé ce caractère dans la sensibilisatrice que renferme le sérum de lapins injectés de sérum de chien et qui est active vis-à-vis de ce dernier. Mais, au contraire, les sensibilisatrices de divers sérums que nous avons étudiés n'ont montré qu'une spécificité nulle ou peu marquée. Ces sérums sont notamment ceux qui provenaient d'animaux injectés soit de lait, soit de blanc d'œuf, soit de fibrinogène. Il est vraisemblable que ces matières — substances albuminoïdes du lait, fibrinogène, blanc d'œuf — présentent chez les diverses espèces animales une identité de constitution presque complète, suffisante en tout cas pour qu'un même sérum actif les impressionne également, quelle que soit l'espèce qui les a fournies.

5° Au point de vue de leur propriété sensibilisatrice, les immunsérums peuvent agir parfois sur des éléments provenant de la même espèce animale, mais non identiques à ceux qui ont servi à la production du sérum. Ainsi un sérum d'animal injecté de sang de poule agit sur le blanc d'œuf de poule. Mais les choses ne se passent pas de même dans tous les exemples que l'on peut considérer, et il n'y a pas de règle générale à établir à cet égard.

Ce travail a été fait à l'Institut provincial de bactériologie du Brabant, à Bruxelles. Nous remercions M. le Dr Bordet, qui dirige cet établissement, de l'intérêt si vif et si éclairé qu'il nous a amicalement témoigné au cours de ces recherches.

RECHERCHES
SUR LES ANTICORPS DES SPORES

PAR W. DEFALLE.

(Travail du laboratoire de l'Institut bactériologique de l'Université de Liége.)

On connaît bien aujourd'hui les propriétés acquises par le sérum des animaux traités par toute une série de substances et d'éléments étrangers. On sait que l'injection de certaines albumines et de la plupart des diastases est suivie de l'apparition dans les humeurs de substances antagonistes produisant habituellement *in vitro* la précipitation de l'élément résorbé par l'organisme. On a déterminé aussi les propriétés nouvelles acquises par le sérum des animaux auxquels on a injecté des microbes ou d'autres éléments cellulaires tels que les hématies, les globules blancs du sang, les spermatozoïdes, et même des cellules d'organes nobles comme les centres nerveux, le foie, le rein, etc. En vertu d'une loi générale, le sérum se charge, à la suite de la résorption par l'organisme de tous ces éléments étrangers, de substances encore mystérieuses dans leur composition, et qui constituent tout un groupe de produits variés auxquels on donne le nom générique d'*anticorps*, comprenant les *précipitines*, les *agglutinines*, les *sensibilisatrices*, les *stimulines*, etc.

Bien que l'on ait vérifié déjà au point de vue de la formation des anticorps la plupart des substances susceptibles d'être résorbées dans l'organisme, il existe tout un groupe d'éléments qui n'a fait jusqu'à présent l'objet d'aucune recherche *systématique* dans cette direction : ce sont les *spores* des microbes. Et cependant il s'agit là d'éléments biologiques très importants, que les cellules de l'organisme sont capables de s'assimiler avec une grande activité dans certaines circonstances données, résorption dont il importe beaucoup de connaître les résultats au point de vue des qualités nouvelles acquises par les humeurs et spécialement par le sérum [1].

1. C'est Metchnikoff qui a observé le premier directement, sous le microscope, la digestion des spores dans l'organisme. (*Monospora*, chez la Daphnie.) Vaillard a vu l'englobement des spores tétaniques par les leucocytes.

Il faut sans doute chercher la raison de l'abandon dans leque l'étude des anticorps des spores a été laissée jusqu'aujourd'hui dans la difficulté d'obtenir de bonnes préparations pour l'étude *in vitro* de leurs propriétés. La principale de celles-ci, ou tout au moins la plus facile à décéler dans un sérum, est la réaction dite *agglutinante*.

Or, pour la mettre en évidence, il faut que l'on dispose d'émulsions dites *homogènes* de l'élément à étudier, c'est-à-dire de liquides contenant les éléments sensibles en suspension et bien isolés les uns des autres, sans être groupés en amas ou en paquets. Pour étudier l'agglutination des spores en particulier, il faut avoir en sa possession des liquides physiologiques riches en spores nettement isolées et capables de se grouper en flocons sous l'action de la substance active. Or, il est difficile de se procurer des émulsions homogènes de spores : c'est certainement une des raisons pour lesquelles l'étude de leurs agglutinines n'a pas été abordée dans un travail d'ensemble.

Après bien des essais et des tâtonnements, nous avons réussi à obtenir d'excellentes émulsions de spores microbiennes de diverses espèces, sur lesquelles nous avons pu étudier les anticorps des sérums.

Le plan de notre travail est le suivant :

1° Choix des spores et obtention d'émulsions homogènes;

2° Injection de spores à des animaux et recherche des anticorps dans leur sérum (agglutinines et sensibilisatrices) ;

3° Diagnostic des microbes et de leurs spores par leurs anticorps.

I

CHOIX DES SPORES

Le meilleur milieu pour l'obtention de spores abondantes, avec le moins possible de corps bacillaires, faciles à émulsionner en liquide physiologique, est la gélose au bouillon de viande, *non additionné de peptone*. En ensemençant des microbes choisis sur ce milieu de culture réparti en tubes inclinés et en laissant 2 à 3 jours à 37°, on réussit parfaitement à atteindre le but, c'est-à-dire à obtenir des spores abondantes : une *anse* du dépôt

trituré dans un 1 c. c. d'eau salée à 9 0/00 stérilisée montre sous le microscope de très nombreuses spores, bien isolées et parfaitement agglutinables, aussi bien par le sérum correspondant que par les divers agglutinants chimiques signalés par M. Malvoz.

On ne trouve dans ces émulsions que de très rares bacilles, au point que l'on est véritablement en droit de ne pas tenir compte de leur présence : comme on le verra au cours de ce travail, ces quelques corps bacillaires sont une quantité négligeable dans le phénomène.

Après beaucoup d'essais, nous avons fixé notre choix sur les microbes suivants pour la production de spores et les expériences variées que nous avions à instituer :

Bacillus mycoïdes;
Bacillus mesentericus vulgatus;
Bacillus subtilis;
Bacillus alvei (microbe de la loque des abeilles);
Vaccin I du charbon (vaccin O T);
Charbon atténué par le phénol (charbon-phénol).

Toutes ces cultures provenaient de la collection de l'Institut bactériologique de l'Université de Liége.

II

INJECTIONS AUX ANIMAUX ET RECHERCHE DES ANTICORPS DANS LE SÉRUM

Nous avons injecté à des animaux, surtout au chien et au cobaye, tantôt sous la peau, tantôt par voie péritonéale, des émulsions très concentrées de diverses spores.

Bien que les spores choisies pour ces injections fussent celles de microbes non pathogènes pour nos animaux, il fallait se demander tout d'abord si l'injection de ces spores encore vivantes n'était pas suivie de leur germination dans l'organisme, et si les propriétés antagonistes que le sérum allait éventuellement accuser n'étaient pas la conséquence de la résorption non pas des spores comme telles, mais des bacilles produits de leur développement chez l'animal. Pour résoudre ce premier point, il n'y avait qu'à rechercher si les spores complètement tuées, et incapables de germer, pouvaient encore, à la suite de leur

résorption, conférer au sérum des propriétés spécifiques. On sait déjà que les microbes typhiques, cholériques, etc., après avoir été chauffés, sont encore capables de rendre le sérum agglutinant après leur injection aux animaux; seulement on ne chauffe ces microbes qu'à 60°-65°, température suffisante pour les tuer; mais pour tuer sûrement des spores, il faut un chauffage prolongé dans l'autoclave à vapeur à 115°.

L'injection d'éléments ayant subi une pareille altération serait-elle encore suivie de l'apparition d'anticorps dans le sérum? C'était là un point tout particulièrement intéressant à vérifier.

Expériences I et II. — Deux chiens de moyenne taille reçoivent, à des intervalles de trois à quatre jours, des injections sous-cutanées de spores.

Au chien I, on injecte chaque fois le dépôt d'un tube de gélose non peptonée, trituré dans l'eau physiologique stérilisée, de spores de *bacillus mycoïdes* non chauffées.

Au chien II, on inocule la même quantité d'une émulsion des mêmes spores, mais préalablement tuées par un chauffage prolongé dans la vapeur à 115° (on s'est assuré par des cultures de la mort des spores).

Avant les injections, on avait prélevé un peu de sang chez ces chiens, et constaté que le sérum n'agglutinait nullement les spores, même à parties égales de sérum et d'émulsion.

Disons une fois pour toutes que le phénomène de l'agglutination a toujours été observé de la même façon et suivant la même technique dans toutes nos expériences : ce n'est qu'en suivant scrupuleusement ces indications que l'on peut avoir des résultats comparables. On dépose sur un porte-objet, à chacune de ses extrémités, une anse de l'émulsion qui servira de témoin et une autre anse de l'émulsion à laquelle on ajoute d'abord partie égale de sérum, ensuite des dilutions de plus en plus considérables de celui-ci, bien entendu en changeant chaque fois l'anse d'émulsion.

Les préparations sont tenues pendant plusieurs heures en observation en chambre humide et examinées fréquemment.

Le sérum normal de chien n'agglutine donc pas les spores du bacillus mycoïdes. Mais après 9 injections, le sérum du chien I (à spores non tuées) présentait un pouvoir agglutinant

bien marqué dont le titre était de 1/120, c'est-à-dire qu'une partie de sérum était capable de transformer en flocons 120 parties de l'émulsion sporifère. Dans ce phénomène d'agglutination, on ne voit pas la moindre trace de précipité autour des spores, comme dans le phénomène de l'agglutination bacillaire : les éléments impressionnés se rapprochent de plus en plus et on obtient des amas de 20, 30, 50 spores et même davantage. (Les rares bacilles des préparations ne prennent pas part au phénomène, à moins que parfois ils ne soient entraînés passivement dans les amas.)

Fait presque inattendu, le sérum du chien II (à spores tuées à 115°) non seulement présentait un fort pouvoir agglutinant, mais déjà après 7 injections le titre était de 1/170, supérieur à celui du chien I. Il est vrai que ce chien II était un peu plus petit de taille que le chien I. Mais l'essentiel, c'était la preuve obtenue que les spores complètement tuées confèrent au sérum un pouvoir agglutinant relativement considérable, et on peut affirmer que les agglutinines ne sont pas produites par les bacilles issus des spores qui auraient germé dans l'organisme.

Disons encore que les émulsions de spores tuées à 115° ne diffèrent pas, au microscope, des émulsions non chauffées : les spores sont parfaitement distinctes, bien isolées les unes des autres; il ne serait pas possible de reconnaître au microscope une émulsion qui a été chauffée à cette température.

Et l'on est amené ainsi à constater un phénomène très curieux, c'est que les spores ayant subi l'action d'une température aussi élevée subissent encore parfaitement l'action des agglutinines spécifiques.

Le sérum du chien I agglutinait les spores tuées au titre de 1/120, celui du chien II au titre de 1/130 : il y a une légère diminution, mais peu prononcée, comparativement aux spores non tuées.

Une autre question qui se pose est celle de savoir si le sérum qui agglutine si nettement les spores présente les mêmes propriétés vis-à-vis des bacilles de l'espèce correspondante.

Des émulsions en eau salée de *bacillus mycoïdes* sont agglutinées par le sérum du chien I au titre de 1/40, par celui du chien II au titre de 1/20 (le sérum normal du chien n'agglutine pas des microbes à ces dilutions).

Mais la production d'agglutinines pour les bacilles chez ces deux animaux ayant reçu des spores, n'est-elle pas simplement due à la résorption des quelques débris de corps bacillaires présents dans les émulsions de spores injectées ? Il semble bien qu'il en soit ainsi : en effet (Exp. III et IV), si l'on injecte comparativement à deux animaux des émulsions non plus de spores, mais de bacilles (provenant de cultures en gélose *peptonisée*), les unes non chauffées, les autres chauffées à 115°, s'il est vrai que l'on obtient encore un sérum agglutinant avec ces dernières, le titre est inférieur à celui du sérum de l'animal ayant reçu des bacilles vivants. Tandis que l'injection des spores chauffées à 115° confère au sérum un pouvoir agglutinant aussi intense que l'injection des spores intactes, il n'en est pas de même pour les bacilles proprement dits, qui, après avoir subi l'action destructive d'une haute température, produisent, par leur résorption dans l'organisme, moins d'agglutinines, toutes choses égales d'ailleurs, que les bacilles vivants et intacts. C'est — on le verra plus loin — dans la résistance de la membrane de la spore à l'action des hautes températures qu'il faut chercher la raison de ces différences.

Si, au lieu du chien, on s'adresse à d'autres animaux, tels que les cobayes, on obtient également des agglutinines pour les spores.

Trois cobayes (Expériences V, VI, VII) reçoivent dans la cavité péritonéale 2 injections, à 10 jours d'intervalle, d'émulsions de spores de bacillus mycoïdes, de bacillus mesentericus et de bacillus alveï.

Le sérum de ces cobayes n'agglutinait pas, à parties égales, les émulsions de ces spores.

Après deux injections intrapéritonéales, le cobaye V donnait un sérum agglutinant les spores de bacillus mycoïdes à 1 p. 40 ; le cobaye VI idem, les spores du bacillus mesentericus à 1 p. 10 ; le cobaye VII idem, les spores du bacillus alveï à 1 p. 2.

On voit que ces spores de microbes différents qui, au microscope, se montrent presque identiques comme aspect, dimensions, etc., au point qu'il est impossible de les différencier par cet examen, ne se comportent pas de la même façon dans la

production des agglutinines, au point de vue quantitatif.

Dans une autre expérience (Expérience VIII), on a injecté dans le péritoine du cobaye des spores chauffées à 115° de bacillus mycoïdes. Le titre agglutinant obtenu a été de 1/25, un peu plus faible que dans l'expérience V où il s'agissait de spores non tuées. Le cobaye se comporte donc comme le chien, qu'il s'agisse de l'injection à spores tuées ou non tuées.

Vis-à-vis du *bacillus mycoïdes* lui-même, le sérum d'un cobaye (Expérience IX), ayant reçu des spores non tuées, agglutine l'émulsion de bacilles au titre de 1/40, tandis que le sérum d'un autre cobaye (Expérience X), traité par des spores chauffées à 120°, n'agglutine que faiblement les bacilles. Ici encore, il faut attribuer l'agglutination des bacilles par le sérum de l'animal qui a reçu des spores, à la présence inévitable dans l'émulsion injectée de quelques corps bacillaires. En effet (Expériences XI et XII), l'injection à deux cobayes, à l'un de bacilles intacts, à l'autre de bacilles chauffés à 115°, donne plus d'agglutinines dans le premier cas que dans le second.

Le sérum d'un animal traité par des émulsions bacillaires (cultures très jeunes sur milieux peptonisés) agglutine-t-il les spores?

Un cobaye (Expérience XIII) ainsi injecté de bacilles sans spores donne le sérum agglutinant les bacilles mycoïdes à 1/170, mais sans la moindre action de ce genre sur les spores.

Nous nous sommes aussi demandé si les spores des moisissures étaient capables de conférer au sérum des animaux injectés des propriétés agglutinantes. Un cobaye (Expérience XIV) a reçu dans la cavité péritonéale des spores d'un mucor. On avait obtenu celles-ci en promenant un pinceau stérile sur des végétations d'une culture de cette moisissure ; de cette façon, on prépare un liquide très riche en grosses spores. Le sérum n'a pas gagné le moindre pouvoir agglutinant pour ces spores. Il est infiniment probable que l'enveloppe de ces spores est toute différente comme constitution de la membrane des spores microbiennes, et qu'elle ne subit pas dans l'organisme les phénomènes de digestion nécessaires à l'élaboration des anticorps.

Mais les agglutinines ne sont pas les seules substances qui apparaissent dans le sérum des animaux traités par des éléments

étrangers. On attache de plus en plus d'importance à d'autres substances antagonistes, que les beaux travaux de Bordet nous ont appris à déceler *in vitro* dans les sérums, et qui sont les *sensibilisatrices* de ce savant, encore appelées *fixateurs* par Metchnikoff, *corps intermédiaires* ou *ambocepteurs* par Ehrlich, *immunisines* par Sawtchenko, etc. Ces substances qui résistent, comme les agglutinines, à un chauffage du sérum à 56°-57° sont un produit spécifique de sécrétion de l'organisme impressionné par des éléments étrangers, tels que les microbes, les spermatozoïdes, etc.

Pas plus que les agglutinines, les sensibilisatrices des spores n'avaient été étudiées jusqu'à présent. Il est vrai que jusque dans ces tout derniers temps, on ne disposait pas d'un procédé permettant de déceler la présence des fixateurs *in vitro*. On doit à MM. Bordet et Gengou la révélation d'une méthode aussi précise qu'ingénieuse, qui donne le moyen de mettre assez aisément en évidence les sensibilisatrices des sérums antimicrobiens. Grâce à cette méthode, on a pu découvrir déjà les fixateurs spécifiques des sérums typhique, cholérique, pesteux et charbonneux (Bordet et Gengou), tuberculeux (Widal), diphtérique (Lambotte).

Cette méthode est basée sur les principes suivants :

Si l'on ajoute à des microbes une certaine proportion d'un sérum spécifique chauffé à 56°, ses sensibilisatrices se fixent fortement sur les corps microbiens et ceux-ci acquièrent une propriété qu'ils ne possédaient pas, celle d'absorber l'alexine du sérum frais, cette substance mystérieuse qui se trouve dans tous les sérums et qui a notamment la propriété de détruire les hématies quand celles-ci ont été sensibilisées par leur sérum spécifique chauffé à 56°.

Si la résorption des spores dans l'organisme est suivie de l'apparition dans le sérum de substances sensibilisatrices, on devait les déceler par la méthode Bordet-Gengou. C'est ce que la série suivante d'expériences va mettre en lumière.

Nous avons commencé par préparer un sérum hémolytique spécifique, en injectant 5 centimètres cubes de sang de poule défibriné à un lapin, sous la peau, trois fois de suite, à huit jours d'intervalle entre chaque injection. Après un mois, on saigne le lapin, on recueille le sérum par une saignée à la caro-

tide et on en fait une provision qui est chauffée 30 minutes à 56°. Ce sérum chauffé a la propriété de sensibiliser les hématies fraîches de poule bien lavées à l'eau salée physiologique, c'est-à-dire de rendre celles-ci très sensibles à l'action destructive du sérum normal frais non chauffé (*alexine*) aussi bien du lapin que du chien et du cobaye, ainsi que nous nous en sommes assuré dans de nombreux essais.

Toutes les expériences sur les sensibilisatrices des spores ont été conduites d'une façon identique : on prépare d'abord des émulsions, soit des spores, soit des microbes correspondants, en eau salée physiologique à 9 0/00. On introduit 4 gouttes de cette émulsion dans un petit tube à essai, et on y ajoute 12 gouttes du sérum dans lequel il s'agit de rechercher les sensibilisatrices, préalablement chauffé à 56° pendant 30 minutes ; on agite le mélange et on l'additionne enfin de 2 gouttes de sérum normal frais provenant d'un sang recueilli la veille (alexine). On laisse 6 heures en contact à la température de la chambre. Entre temps, on a recueilli du sang de poule que l'on défibrine par agitation avec des perles de verre, et dont on lave plusieurs fois les globules à la turbine au moyen d'eau salée physiologique; on sensibilise ces globules en y ajoutant 1 c. c. de sérum hémolytique chauffé du lapin traité par le sang de poule, pour 10 gouttes de globules.

Après les 6 heures de contact du sérum spécifique, des spores et de l'alexine, on ajoute à ce mélange 2 gouttes du liquide contenant les globules de poule, on agite, on place le tube à essai pendant 1 heure à 37° et ensuite à la température de la chambre. Si le sérum que l'on étudie contient des sensibilisatrices pour l'élément correspondant (spores), l'alexine n'est plus libre dans le mélange et les hématies de poule restent intactes. Mais s'il n'y a pas de sensibilisatrices, les hématies de poule sont rapidement détruites par l'alexine et le contenu du tube prend une teinte rouge laque caractéristique; un contrôle microscopique montre les globules de poule détruits complètement, réduits à leur noyau.

Cette méthode a été appliquée à toute une série de sérums d'animaux traités par des spores tantôt intactes, tantôt préalablement chauffées à 115°; les résultats sont consignés dans le tableau suivant. Comme toujours dans des expériences de ce

genre, on s'est assuré que des tubes-témoins contenant les uns du sérum normal, les autres de l'eau physiologique, en remplacement du sérum spécifique, ne révélaient pas de sensibilisatrices.

Expériences. I. *a*) Sérum chauffé à 56° de chien ayant reçu 7 injections de spores de bacillus mycoïdes chauffées à 115° + spores de bacillus mycoïdes non chauffées + alexine de chien. Après 6 heures, addition d'hématies sensibilisées : *pas d'hémolyse.*

b) Même essai, mais au lieu de spores non chauffées, spores tuées à 115° : *pas d'hémolyse.*

Témoins : eau salée + spores de bacillus mycoïdes + alexine de chien; après 6 heures hématies sensibilisées : *hémolyse rapide.*

Sérum normal chien chauffé + bacillus mycoïdes + alexine de chien : *hémolyse rapide.*

2. Sérum chauffé à 56° de chien injecté de spores de b. mycoïdes chauffées à 115° + spores non chauffées de b. mycoïdes + alexine de lapin, etc. : *pas d'hémolyse.*

Témoins : eau salée + spores idem : *hémolyse rapide.*

Sérum normal chien chauffé + idem *hémolyse rapide.*

3. *a*) Sérum chauffé à 56° de chien injecté de spores mycoïdes non chauffées + spores de mycoïdes non chauffées + alexine de chien, etc. : *pas d'hémolyse.*

b) Expérience avec le même sérum, mais agissant sur spores chauffées à 115° + alexine de chien, etc. : *pas d'hémolyse.*

c) Même essai, mais alexine de lapin au lieu d'alexine de chien : *pas d'hémolyse.*

N. B. — Quand il est dit : *pas d'hémolyse*, ce qui correspond à *présence de sensibilisatrice*, l'observation a été prolongée un jour, c'est-à-dire qu'après 24 heures les globules de sang sont encore intacts.

Ces essais démontrent nettement :

1° Que le sérum normal de chien ne renferme pas de sensibilisatrices pour les spores;

2° Que l'injection de spores de bacillus mycoïdes à des chiens, qu'elles soient vivantes ou tuées par un long chauffage dans la vapeur à 115°, est suivie de l'apparition dans le sérum de

substances dites sensibilisatrices pour ces spores, qu'elles soient elles-mêmes tuées ou non tuées;

3° Que les spores sensibilisées fixent non seulement l'alexine de l'animal de l'espèce injectée (chien), mais même l'alexine d'autres espèces (lapin).

Il eût été intéressant de rechercher si les injections de bacilles confèrent au sérum des propriétés sensibilisantes pour les spores correspondantes, et inversement : ces recherches, nous les avons faites, mais les résultats sont discutables, parce qu'il est très difficile d'obtenir des spores absolument libres de bacilles, et on est amené à considérer comme sensibilisatrices de spores, par exemple des produits qui agissent sur les bacilles.

Mais ce qui est certain, c'est que l'injection aux animaux de bacillus mycoïdes (culture *très jeune* sur gélose peptonisée) ne contenant pas de spores, et tués par un chauffage dans la vapeur à 115°, ne rend pas le sérum sensibilisant pour les bacilles, ainsi que le montrent les essais suivants, contrairement à ce qui se produit quand on injecte des bacilles non tués.

Expériences. 1. *a*) Sérum chauffé à 56° de cobaye injecté deux fois de bacillus mycoïdes vivants sans spores + bacillus mycoïdes vivants + alexine de lapin. Après 6 heures, addition d'hématies sensibilisées de poule : *pas d'hémolyse* (*forte agglutination des bacilles*).

b) Même essai, mais avec alexine de cobaye : *pas d'hémolyse.*

Témoins : eau salée + etc. : *hémolyse.*

2. *a*) Sérum chauffé à 56° de cobaye injecté deux fois de bacillus mycoïdes tués à 115° + bacillus mycoïdes vivants + alexine de cobaye, etc. : *Forte hémolyse* (*et forte agglutination des bacilles*).

b) Même essai, mais bacillus mycoïdes tués à 115° : *forte hémolyse et agglutination des bacilles.*

Ces expériences comportent plus d'un enseignement.

Elles démontrent d'abord que l'injection des bacilles tués à 115° n'amène pas la production de sensibilisatrices pour les microbes. Quand donc, comme dans la première série d'expériences, on obtient, après l'injection de spores tuées à 115, des sensibilisatrices pour ces dernières, on peut affirmer que c'est

bien à la résorption des spores comme telles, et non à celle des quelques rares corps microbiens qui les accompagnent, qu'il faut attribuer la production de ces substances spécifiques.

Mais ces expériences de comparaison entre les anticorps des spores et ceux des bacilles correspondants nous ont amené à une autre constatation très intéressante, *l'indépendance des agglutinines et des fixateurs des sérums.*

On vient de voir, en effet, que s'il est très facile d'obtenir des sensibilisatrices pour les bacillus mycoïdes, en injectant des émulsions fraîches de bacillus mycoïdes *vivants*, on n'obtient plus cette variété d'anticorps si les injections sont faites au moyen des mêmes bacillus modifiés et tués par un chauffage dans la vapeur à 115°. Il y a plus : ce sérum d'animaux traités par des microbes ainsi chauffés, s'il n'est plus sensibilisant pour les microbes, est encore nettement agglutinant pour ces derniers, et d'une façon spécifique, ainsi que nous nous en sommes assuré en faisant agir le sérum sur d'autres microbes. Voilà donc un nouveau fait à mettre en avant pour établir la possibilité de la *dissociation des propriétés agglutinante et sensibilisatrice.* Ces expériences doivent être mises en parallèle avec des résultats obtenus à l'Institut bactériologique de Liége par M. le docteur Albert Dubois. D'après des expériences non publiées de ce dernier, on peut aussi montrer l'indépendance des agglutinines et des sensibilisatrices des globules rouges en injectant d'une part des hématies non chauffées en suspension dans l'eau physiologique, et d'autre part des hématies chauffées à 115°. Les animaux de la première série fournissent un sérum à la fois riche en agglutinines et en sensibilisatrices pour les globules injectés, tandis que ceux qui ont reçu des hématies modifiées à 115°, s'ils présentent un sérum agglutinant et spécifique, c'est-à-dire n'agglutinant que l'espèce d'hématies injectées, ce sérum est tout à fait dépourvu de fixateurs, et n'est plus hémolytique.

Si on compare les qualités du sérum après des injections faites au moyen de *corps bacillaires* et de *globules du sang*, chauffés et non chauffés, avec les propriétés du sérum après l'injection de *spores* chauffées et non chauffées, on est immédiatement frappé d'une différence essentielle : c'est que le sérum des animaux traités par des spores tuées à 115° contient non

seulement des agglutinines, mais également des substances sensibilisatrices! On n'a qu'à se reporter aux premières séries de nos expériences pour s'assurer de la netteté de cette constatation.

Quelle peut être la raison de ces différences dans les produits de la résorption des bacilles et des hématies, d'une part, des spores, de l'autre?

Nous croyons qu'il faut expliquer ces faits par la constitution particulière de la spore qui, on le sait, présente une membrane d'enveloppe nettement différenciée et d'une grande résistance à tous les agents physico-chimiques. D'après cette hypothèse, les microbes proprement dits et les globules rouges, éléments dépourvus d'une membrane différenciée et résistante, éléments véritablement nus, sont quand on les chauffe à 115°, tellement altérés dans leur composition, que les substances spéciales dont la digestion dans l'organisme est suivie de l'apparition d'anticorps sensibilisants sont détruites, et par suite il n'y a plus de formation de fixateurs. Par contre, les substances du microbe ou du globule rouge dont la résorption produit les agglutinines résistent mieux, même à 115°, d'où le pouvoir agglutinant du sérum après l'injection de microbes ou d'hématies chauffées à cette température.

Si maintenant, les spores chauffées à 115° confèrent au sérum, après leur digestion dans l'organisme, la double propriété agglutinante et sensibilisatrice, ce ne peut être, semble-t-il, que dans la résistance toute particulière à la chaleur des substances qui constituent la membrane de la spore qu'il faut en chercher la raison. L'enveloppe de la spore renferme vraisemblablement des produits protéiques, encore suffisamment intacts après un chauffage à 115° pour que leur résorption amène la formation des deux variétés d'anticorps. S'il en est bien ainsi, l'injection d'autres microorganismes pourvus comme les spores d'une membrane résistante et différenciée, et chauffés à 115°, doit conférer au sérum les mêmes propriétés que les spores.

M. Malvoz, qui étudie depuis longtemps les anticorps des levures, nous a communiqué les résultats d'expériences encore inédites, qui confirment l'hypothèse qui vient d'être énoncée. Les levures possèdent une belle membrane que certains savants considèrent comme constituée par des substances excessivement résistantes du groupe de la chitine.

Si l'on injecte comparativement à des lapins des émulsions de levure (M. Malvoz se sert dans tous ses essais d'une levure qui s'émulsionne très facilement, et se prête particulièrement à l'étude de l'agglutination, *la levure du vin de Huy*), les unes préparées avec de la levure vivante, les autres avec de la levure chauffée à 115°, le sérum, après 7 à 8 injections sous cutanées, devient à la fois agglutinant et sensibilisateur pour la levure injectée, aussi bien chez les animaux traités par la levure tuée que chez les autres. Et la preuve que c'est bien la capsule qui est en jeu dans tous ces phénomènes, et non le protoplasme du micro-organisme, c'est que les levures ayant subi l'autodigestion sous le chloroforme pendant plusieurs semaines, et réduites ainsi à leurs capsules avec quelques détritus de matières grasses à l'intérieur, ces levures sont nettement sensibilisées par leur sérum spécifique et confèrent aux animaux la propriété sensibilisatrice des humeurs.

Quelle que soit d'ailleurs la raison des différences constatées dans nos essais d'injection de microbes nus d'une part, de spores de l'autre, le fait important c'est qu'il devient de plus en plus difficile de soutenir l'identité des substances agglutinante et sensibilisatrice, que certains savants admettent encore. Nos expériences confirment la thèse soutenue notamment par Bordet que les agglutinines et les fixateurs sont des produits différents.

Enfin, un dernier point qu'il nous a fallu vérifier, pour compléter cette étude des anticorps des spores, c'est la recherche du pouvoir microbicide ou mieux *sporicide in vitro*. Ce sérum spécifique contre les spores contenant des agglutinines et des fixateurs est-il assez puissant, avec l'aide de ses alexines, pour tuer les spores, ou tout au moins les empêcher de germer *in vitro?* En d'autres termes, ce sérum se comporte-t-il comme certains sérums antimicrobiens, tels que le choléra-sérum, le proteus-sérum, tuant facilement les microbes en dehors de l'organisme? Nous avons ajouté à 1 c. c. de nos sérums non chauffés, contenant encore leur alexine, 1 anse de spores. Nous n'avons pas constaté, par la méthode des plaques, c'est-à-dire par des ensemencements en gélatine nutritive coulée en boîtes Petri, après 1 heure, 8 heures, 24 heures, de diminution du nombre des spores. Celles-ci sont trop résistantes pour être tuées aussi facilement en dehors de l'organisme. On sait d'ail-

leurs qu'il faut le concours de l'animal vivant immunisé pour que la plupart des microbes, après avoir subi l'action des anticorps spécifiques, soient détruits.

III

DIAGNOSTIC DES SPORES PAR LES ANTICORPS SPÉCIFIQUES

Nous n'avons pas encore abordé l'importante question de savoir si un sérum contre une espèce de spores est hautement spécifique, en ce sens qu'il n'agglutinerait ou ne sensibiliserait que cette espèce, à l'exclusion des spores d'autres microbes.

A un autre point de vue, peut-on instituer une méthode *pratique* de diagnostic des spores par leur sérum correspondant, comme on possède des sérums servant au diagnostic de certains bacilles et de certaines hématies?

Le sérum d'un chien traité par plusieurs injections de spores de vaccin du charbon (Vaccin O T) agglutinait ces spores au titre de 1/120, mais il avait la même action sur les spores du bacille mycoïdes.

Le sérum de chien traité par les spores de B. mycoïdes agglutine, à plus de 1/100, non seulement les spores de ce microbe, mais les spores du charbon-phénol et du bacillus subtilis. Par contre, il agglutine très peu (1/20) les spores de bacillus mesentericus et de bacillus alveï.

Si l'on étudie l'action du sérum contre les spores, non plus sur les spores vivantes, mais sur les spores tuées à 115°, on note que le sérum contre les spores de bacillus mycoïdes agglutine celles-ci (chauffées) à 1/110, à 1/100 les spores tuées du B. subtilis, et à 1/40 les spores tuées du B. mesentericus. Et un autre sérum, obtenu à la suite de l'injection de spores de mycoïdes chauffées à 115° agglutine les spores tuées de ce microbe à 1/130, celles du subtilis tuées à 1/115 et celles de mesentericus tuées à 1/65.

On voit que tous ces sérums contre les spores, s'ils manifestent une certaine spécificité d'agglutination vis-à-vis de l'espèce de spores injectée, présentent cette propriété à un degré beaucoup moindre que les sérums antibacillaires.

Il serait actuellement prématuré de proposer une méthode de diagnostic des spores par leur sérum spécifique. On comprend d'ailleurs très bien cette spécificité limitée des sérums contre les spores. Ces éléments ont des caractères microscopiques, des dimensions, des réactions microchimiques très voisines : qui saurait diagnostiquer au microscope des spores isolées de tel ou tel microbe ?

Au contraire, les éléments bacillaires se comportent tout autrement vis-à-vis de leurs sérums, et sont bien plus faciles à différencier par leurs anticorps, grâce à leurs particularités (existence ou absence d'une enveloppe ou de cils plus ou moins abondants, etc., autant d'éléments jouant un grand rôle aussi bien dans la production des agglutinines que dans le degré de sensibilité à ces dernières [1]). Il convient d'ailleurs d'ajouter que la spore de l'espèce injectée s'est toujours rencontrée plus sensible au sérum que d'autres spores : c'est bien la preuve qu'il existe des différences dans la composition chimique intime de chaque spore. Nos expériences suffiraient à elles seules à démontrer une fois de plus que les sérums immunisants révèlent des propriétés que le chimiste le plus expert ne peut mettre en lumière.

Quant à la spécificité des sensibilisatrices, s'il est certain que ce sont surtout les spores de l'espèce microbienne correspondante qui fixent ces substances du sérum, il faut bien dire que d'autres spores subissent également l'impression de ces fixateurs. Si l'on possédait une méthode de mesure de la quantité de sensibilisatrice contenue dans un sérum donné, il serait peut-être possible de prouver que le sérum contre une spore donnée renferme plus de fixateurs pour cette spore que pour d'autres. Mais, jusqu'à présent, on n'est pas arrivé à trouver une méthode quelque peu précise permettant de titrer les sensibilisatrices comme on titre les agglutinines.

Il serait fastidieux de reproduire les nombreux essais que nous avons faits de croisement de sérums contre certaines spores et de spores d'autres espèces.

Il suffira de citer ceux-ci :

Le sérum d'un chien traité par des spores tuées de B.

1. W. Defalle. Rôle de l'enveloppe des microbes dans l'agglutination. *Annales Pasteur*, août 1902.

mycoïdes sensibilise non seulement les spores, tuées ou non, de ce microbe, mais aussi les spores de subtilis, tuées ou non, et de mesentericus. Ce chien avait reçu 7 injections de spores ; pour démontrer la présence de sensibilisatrices, on a eu recours à la méthode déjà décrite, et on s'est assuré en même temps que le sérum normal de chien ne renfermait pas de fixateurs pour ces diverses spores.

Il ne semble donc pas possible, à l'heure actuelle, de proposer une méthode de diagnostic des spores soit par les sensibilisatrices, soit par les agglutinines des sérums contre ces éléments.

Réussirait-on mieux en se servant des *agglutinants* dit *chimiques ?* On doit à M. Malvoz et à ses élèves la découverte de quelques substances purement chimiques qui produisent l'agglutination des bacilles aussi fortement que leurs sérums spécifiques : citons la formaline pure, l'alcool, les acides minéraux dilués, l'acide acétique, certaines matières colorantes, etc.

Nous avons soumis nos diverses espèces de spores en émulsion dans l'eau physiologique à l'action de ces substances agglutinantes.

La formaline pure agglutine très légèrement les spores, vivantes ou tuées à 115°, à parties égales de cet agent et d'émulsions de spores, quand il s'agit des spores de B. mycoïdes, de vaccin O T et de charbon-phénol. La formaline plus ou moins diluée n'a plus le moindre pouvoir agglutinant (différence avec les corps bacillaires).

L'alcool fort n'agglutine pas les spores. La soude, qui au titre de 1/80 à 1/100, agglutine fort bien les bacilles de diverses espèces, n'agglutine que faiblement les spores et au titre de 1/15.

Le meilleur agent d'agglutination pour les spores, tuées ou non, est l'acide acétique : soit pur, soit dilué jusque 1/300, il agglutine nettement ces éléments.

En résumé, il apparaît que les bacilles — tels que le B. typhosus, le B. mycoïdes, le B. mesentericus, etc, — sont bien plus sensibles à l'influence des agglutinants chimiques que les spores microbiennes. Le B. typhosus — ainsi que M. Malvoz l'a montré — est encore agglutiné nettement par l'acide acétique

à 1 p. 5000, de même que ses émulsions subissent une forte agglutination par l'alcool, la soude à 1 p. 100, la formaline, etc., etc.

C'est encore une fois dans la présence d'une membrane différenciée et d'une constitution toute différente des microbes qu'il faut chercher la raison, en partie tout au moins, de ces différences entre bacilles et spores dans la sensibilité aux agglutinants chimiques. Les levures — qui elles aussi sont pourvues d'une membrane particulière — se comportent sensiblement comme les spores vis-à-vis de ces substances agglutinantes : la formaline n'a pas d'action et l'acide acétique n'agit que concentré, incomparablement moins activement que sur les bacilles typhique, mesentericus, etc.

Les spores de moisissures qui, on l'a vu, ne confèrent pas au sérum des animaux injectés la propriété agglutinante, sont insensibles aux agglutinants chimiques : à ce nouveau point de vue encore, on voit que leur constitution, et notamment leur membrane, doit être toute différente des spores microbiennes.

CONCLUSIONS

1. L'injection de spores microbiennes aux animaux est suivie de la production d'anticorps (agglutinines et sensibilisatrices) dans leur sérum. Au contraire, l'injection de spores de moisissures ne confère pas de propriété spéciale au sérum.

2. Cette production d'anticorps est certainement le résultat de la résorption des spores comme telles et non de leur germination dans l'organisme, puisque les résultats sont sensiblement les mêmes, qu'il s'agisse de l'injection de spores non pathogènes complètement tuées ou de spores vivantes.

3. Les anticorps des spores — tout en étant plus actifs vis-à-vis de la variété de spores ayant servi à l'injection — agissent aussi sur les spores d'autres espèces microbiennes.

4. Dans la formation d'anticorps par l'organisme, les spores se comportent tout différemment des bacilles. Les bacilles vivants, ou modérément chauffés, confèrent au sérum les

pouvoirs agglutinant et sensibilisateur, tandis que les bacilles chauffés à 115° ne produisent plus, après leur résorption, que les agglutinines. Au contraire, après l'injection de spores chauffées à 115°, le sérum renferme à la fois des agglutinines et des sensibilisatrices. L'indépendance des deux propriétés principales des sérums est établie très nettement par ces faits.

5. La connaissance des sensibilisatrices et des agglutinines, tant celles des sérums que les agglutinines chimiques, ne permet pas de fonder une méthode *pratique* de diagnostic des diverses espèces de spores.

Note sur diverses pasteurelloses observées en Turquie

Par M. M. NICOLLE

PNEUMONIE DES CHÈVRES

Nous compléterons, sur quelques points, l'étude que nous avions entreprise, en 1896, avec le docteur Réfik-bey, étude qui n'a pu être continuée, par suite de circonstances regrettables.

Lésions nécrotiques observées chez les animaux qui succombent tardivement. — Quand l'affection (naturelle) ne suit pas une marche aiguë, c'est-à-dire lorsque les chèvres meurent après plusieurs semaines ou même plusieurs mois, on rencontre, à l'autopsie, des lésions nécrotiques qui peuvent aller jusqu'à l'excavation du poumon.

Dans un premier stade, le tissu pulmonaire, transformé en une masse scléreuse, se montre parsemé d'îlots jaune clair, de consistance un peu élastique, à bords irrégulièrement découpés (en jeu de patience). Le parenchyme induré se prolonge plus ou moins vers le centre de ces îlots et s'y révèle sous forme de petites plaques fibreuses dont la couleur grisâtre fait paraître, à la coupe, l'îlot comme troué. Cette lésion rappelle, à s'y méprendre, l'aspect d'un foyer confluent de gommes syphilitiques, sectionné dans sa longueur.

Lorsque l'excavation s'est produite, on se trouve en présence d'une cavité plus ou moins volumineuse (parfois plus grosse que le poing), qui renferme un bloc nécrosé. A travers la plèvre non incisée, on peut, par la palpation, sentir la mobilité de ce bloc. Si la caverne est de date récente, elle offre les caractères déjà décrits par nous (ces *Annales*, année 1896, p. 323); si elle est plus ancienne, les parois se montrent fibreuses, lisses, humides et sillonnées de reliefs dus à la persistance de grands espaces conjonctifs (caverne à colonnes). La masse nécrotique, sorte d'énorme bourbillon de couleur jaune grisâtre et d'odeur fade, baigne dans une faible quantité de sérosité à peine louche.

La plèvre, qui revêt les lobes chroniquement altérés, apparaît toujours très épaissie. Les parties du parenchyme, voisines de la région malade, sont carnifiées sur une étendue modérée et donnent toujours des cultures du cocco-bacille spécifique. Il est vrai que les premières cultures peuvent être riches en types involutifs (formes en poire, en massue; gros cocci ronds ou lancéolés, etc...) Les viscères ne montrent jamais de lésions spéciales et sont toujours stériles.

Renforcement de la virulence de la pasteurella spécifique. — Nous sommes partis d'un échantillon qui tuait le pigeon, dans le pectoral, à la dose de 2 c. c. de culture de 24 heures en bouillon-sérum. Les passages ont été faits, chez les pigeons, avec des quantités décroissantes de culture. Après 16 passages, la culture tuait le pigeon, dans le pectoral, au 50,000^{e} de c. c. et le lapin, dans la plèvre, au 1,000^{e} de c. c. Après 33 passages, elle tuait le pigeon, dans le pectoral, au 500,000^{e} de c. c. et le chien, dans le poumon, au 10e de c. c. A l'autopsie des chiens ainsi inoculés, on observait une *pneumonie type*, identique à celle des chèvres mortes de l'affection naturelle. Le parasite demeurait aussi, comme dans ce cas, confiné à la lésion pulmonaire.

Essais de vaccination. — Nous avions commencé à vacciner les troupeaux des régions atteintes, en inoculant, sous la peau des animaux, 5 c. c. de culture, de 48 heures, en bouillon, chauffée 1 heure à 60°. Les résultats avaient paru excellents, et nous nous proposions de continuer ces recherches, lorsque cela nous fut interdit, malgré la demande des intéressés.

AUTRES PASTEURELLOSES

Choléra des poules. — Il est très répandu à Constantinople et dans la zone avoisinante. On y connaît de véritables « poulaillers maudits », où, depuis des années, tout élevage est devenu impossible. Entre autres épidémies, nous avons pu en étudier une, très meurtrière, qui a sévi aux Eaux-Douces d'Europe. La plupart des animaux succombaient à la forme classique de l'affection; mais un certain nombre présentaient une *forme purement intestinale*, sans généralisation. Nous ne savons si ce type

toxique, qui mérite au plus haut point le nom de choléra, a déjà été décrit.

Le virus des Eaux-Douces se montrait généralement très actif. Un échantillon, cultivé en bouillon-ascite, a été rapidement renforcé, à l'aide de quelques passages par le pigeon. Il a acquis alors une virulence telle qu'il tuait à « l'unité ». Cette virulence s'est fort bien conservée par la suite, grâce à la culture en bouillon-ascite et à la conservation des semences dans la glacière.

Ce virus a été cultivé dans des milieux variés, pour y rechercher la présence d'une toxine soluble. Nous avons pu nous convaincre, avec le docteur Scouros, que les filtrats de certains de ces milieux, répondant à des cultures de 12 à 40 jours, pouvaient tuer le pigeon, dans le pectoral, en 3 à 8 jours, à des doses variant entre 0 c. c. 31 et 0 c. c. 86 pour 100 grammes d'animal. Nous reviendrons plus tard sur ces recherches.

Pasteurellose des lapins. — Fréquente dans la région de Constantinople. Nous l'avons observée plusieurs fois au laboratoire et, dans certains cas, l'origine de l'affection a pu être nettement rapporté à l'achat d'animaux provenant de clapiers infectés. Les lapins mouraient presque tous, malgré les précautions prises pour arrêter l'extension de la maladie. Tantôt ils succombaient à une septicémie rapide, tantôt ils offraient des localisations broncho-pulmonaires. Dans cette dernière forme, qui prédominait au début et à la fin des épidémies, on ne trouvait généralement la pasteurella spécifique qu'au niveau de l'appareil respiratoire; le sang et la pulpe des viscères donnaient le plus souvent des cultures stériles.

La pasteurella, que nous isolée à maintes reprises avec le docteur Rélik-bey, se montrait peu virulente pour le pigeon. Quelques échantillons seulement le tuaient dans le pectoral, à la dose de 2 c. c. d'une culture de 24 heures en bouillon-ascite.

Pasteurellose des cobayes. — Nous l'avons constatée plus rarement et toujours indépendamment de l'affection précédente. A côté des types septicémique et broncho-pulmonaire, nous avons rencontré, deux fois, une forme singulière, se traduisant par une infiltration séro-purulente de la paroi thoraco-abdominale.

Cette forme, qui paraît dénoter une contamination d'origine externe, fut suivie de mort dans les deux cas.

Pasteurellose équine. — Elle sévit fréquemment près de la frontière bulgare, où elle cause de grands ravages dans les régiments de cavalerie et d'artillerie qui y stationnent. Elle a été étudiée, à plusieurs reprises, par le vétérinaire Adil-bey, qui a pu confirmer, dans ses recherches, le rôle que joue le streptocope gourmeux, comme agent d'infection secondaire.

Pasteurellose ovine. — La *pneumo-entérite* du mouton paraît assez répandue dans les environs de Constantinople. Nous n'avons eu l'occasion d'en étudier que deux cas, au point de vue bactériologique. Dans ces deux cas, nous avons pu isoler aisément l'agent pathogène.

La pasteurellose ovine ne coïncidait jamais avec les épidémies de pneumonie des chèvres observées par nous.

Pasteurellose canine. — Nous nous bornerons à mentionner son extrême rareté chez les chiens de rue, et son assez grande fréquence chez les chiens de chasse.

SUR LE CHAUFFAGE ÉLECTRIQUE DES ÉTUVES

A TEMPÉRATURE CONSTANTE

Par le Dr L. MARMIER

Les régulateurs à gaz, employés habituellement dans les étuves de bactériologie, donnent des températures dont les variations sont à peu près de l'ordre du degré centigrade. Si l'on veut substituer l'électricité au gaz pour le chauffage de ces étuves, il est donc utile de pouvoir régler le débit du courant électrique de façon à obtenir, avec cet agent, des températures présentant des variations du même ordre.

C'est M. Lequeux qui, à ma connaissance, imagina le premier modèle d'étuve électrique. Dans cette étuve, le régulateur était une adaptation à l'électricité du régulateur métallique du Dr Roux. La branche mobile du régulateur métallique en fer à cheval est disposée de façon à toucher constamment l'une ou l'autre de deux tiges métalliques situées de part et d'autre d'elle (par exemple à droite et à gauche de cette branche mobile). Quand le courant électrique chauffe l'étuve, ce courant suit le trajet suivant : il se rend au régulateur métallique, passe de la partie mobile dans une des deux tiges métalliques (supposons que ce soit celle de gauche) et de là se rend au radiateur de l'étuve qui est en connexion avec cette tige. Au fur et à mesure que la température s'élève, la branche mobile du régulateur se déplace, vers la droite dans ce cas, et il arrive un moment où elle touche la tige métallique de droite en se séparant de la tige de gauche. A cet instant, le courant ne passe

plus dans le radiateur, mais dans une résistance extérieure à l'étuve. L'étuve se refroidit, la branche mobile revient vers sa gauche et, quand le contact se rétablit avec la tige de gauche, l'étuve est de nouveau chauffée.

Cet appareil présentait un inconvénient : au moment où le régulateur abandonne une des tiges métalliques, il se forme un arc entre lui et cette tige, arc d'autant plus intense que le radiateur employé est plus puissant.

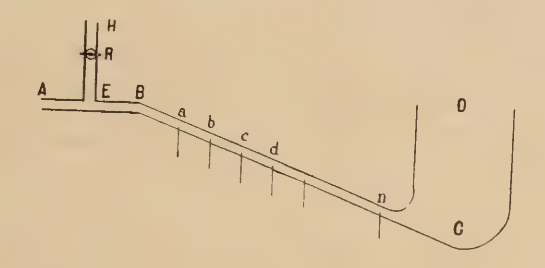
Mais il est facile de remédier à cette situation en se servant d'un relai. On établit ainsi les connexions du courant : secteur, armature mobile du relai, butoir du relai, radiateur, secteur. D'autre part, un des pôles du secteur, si celui-ci est à courant continu, ou un des pôles d'une batterie de piles si on n'a à sa disposition que du courant alternatif, est en relation avec le régulateur. Du régulateur, le courant de ce deuxième circuit passe dans l'une des deux tiges mobiles, de là dans l'un des électro-aimants du relai d'où il retourne à la pile ou au secteur.

L'électro-aimant en connexion avec la tige de gauche, en attirant l'armature mobile du relai, vient appliquer cette armature sur le butoir ; au contraire, l'électro-aimant en connexion avec la tige de droite, au moment où il est actionné, interrompt brusquement le contact entre l'armature et le butoir. Il n'y a donc pas de formation d'arc; seul le courant passant par les électros du relai est à rupture lente, mais ce courant étant très faible, l'inconvénient signalé n'existe plus.

Ce régulateur étant ainsi installé avec un relai (que j'ai pris double pour éviter toute intervention d'un ressort) fonctionne bien et régulièrement. Il donne alors dans l'étuve une température suffisamment uniforme; la courbe des températures présente à la fois des oscillations longues (plusieurs heures) et des oscillations très courtes donnant au trait de la courbe une forme tremblée. Les variations de la température peuvent être, dans certains cas et pour une période de quelques jours, réduites à un degré centigrade.

Quand on désire une température plus constante, on peut employer comme régulateur de température l'appareil suivant, composé de tubes de verre, dont l'ensemble rappelle exactement la forme d'une pipe : à un tube de verre horizontal A B de

1 centimètre de diamètre, fait suite, en B, un tube de même diamètre B C très incliné sur l'horizontale. Ce tube incliné aboutit à la partie inférieure C d'un large tube de verre vertical C D. Dans le tube incliné B C sont enchâssés de distance en distance, tous les 25 millimètres dans le modèle que je possède, des fils de platine. Ces fils de platine, en chacun des points (*a*, *b*, *c*, *d*... *n*) où ils aboutissent, mettent en communication électrique l'intérieur du tube avec le dehors.



Enfin sur la partie horizontale A B du tube est branché verticalement un tube E H muni d'un robinet R.

A l'extérieur du tube, entre *a* et *b*, on place une résistance convenable, de même entre *c* et *d*, etc. Dans le tube on verse une certaine quantité de mercure. Dans la branche large on met ce mercure en relation avec le radiateur de l'étuve, le fil de platine *a*, le plus proche de B, est relié à la source d'électricité dont on dispose. On a donc le circuit : secteur, régulateur du point *a* au point C, radiateur, secteur. On voit dès lors sans peine que si le mercure monte dans la branche inclinée jusqu'en *a*, le radiateur est mis en court circuit sur le secteur ; si le mercure ne vient que jusqu'en b, le courant diminue d'intensité en raison de l'intervention automatique dans le circuit de la résistance placée entre *a* et *b* ; si c'est en *f* que se trouve le mercure, la résistance du circuit est $ab+bc+cd+de+ef+$ radiateur, et ainsi de suite : plus le mercure baisse dans la branche B C, plus grande est la résistance intercalée sur le courant et plus faible est ce courant.

Il est évident que cet appareil peut être employé comme régulateur du courant des étuves électriques. Il suffit en effet de le transformer en un thermomètre à air en mettant en com-

munication avec l'extrémité A du tube horizontal un réservoir d'air placé à l'intérieur de l'étuve. Supposons que l'on ait atteint dans l'étuve la température désirée, on ferme le robinet R, le mercure étant par exemple en *f*. Si la température tend à baisser dans l'étuve, le mercure remonte vers *a*, au moment où il atteint *e*, le courant augmente, d'où élévation de la température; si au contraire la température baisse, c'est l'inverse qui se produit.

On choisit le volume du réservoir d'air suivant la sensibilité qu'on veut demander à l'appareil. Par suite de l'inclinaison très accentuée du tube B C et de la grande largeur du tube vertical, les variations de niveau du mercure seront insignifiantes (quelques millimètres dans la pratique. On a donc un thermomètre à air à pression sensiblement constante. Si V est le volume de l'air à une température *t*, la variation *d* V de volume sera liée à la variation *dt* de la température par l'équation :

$$dV = \frac{V \alpha \, dt}{1 + \alpha t} = \frac{V \, dt}{273 + t}$$

*d*V est le volume compris entre deux des points *a*, *b*, *c*, *d*, etc.; le tube ayant 1 c. c. de diamètre et *a b* ayant 25 millimètres, *d*V a environ 2 c. c. La relation précédente montre qu'avec un réservoir de 2 litres (V = 2000), il faut à peu près une variation de 3/10 de degré pour faire avancer le mercure d'une division, tandis qu'avec un réservoir de 3 litres il suffira de 1/5 de degré pour obtenir le même résultat.

Depuis plusieurs mois j'emploie avec une petite étuve un appareil ainsi construit. Les résistances intercalées entre chacun des points *a*, *b*, *c*... sont en moyenne de 1 ohm chacune. La température est restée rigoureusement constante si on se reporte aux indications du thermomètre enregistreur; elle a varié en réalité de 3/5 de degré si on prend les indications données par les enregistreurs électriques placés sur l'appareil. Ce régulateur peut être employé aussi bien en courant continu qu'en courant alternatif, les connexions électriques à établir : secteur, régulateur, radiateur, secteur sont toujours les mêmes et des plus simples.

Dans le cas où l'on a de grandes chambres étuves en maçonnerie, bien isolées au point de vue rayonnement et conductibilité, on obtient, sans autre appareil de réglage qu'un rhéostat mis sur le circuit des radiateurs, une température uniforme dans ces chambres. A l'Institut Pasteur de Lille, une telle chambre, mesurant $3^{m},40 \times 3^{m},20 \times 2^{m},70$, atteint une température qui se maintient rigoureusement à 29°,5 avec un radiateur absorbant un courant de 9 ampères sous 110 volts, une température de 36° avec un radiateur absorbant 12 ampères sous 110 volts.

Rien n'est donc plus simple que d'avoir dans les grandes chambres étuves des températures constantes au moyen du chauffage électrique. Ce n'est qu'une question de construction de ces chambres.

Enfin, il m'a semblé qu'il serait intéressant de comparer, pour l'étuve dont je me suis servi, la dépense en gaz avec la dépense en électricité. A droite de cette étuve se trouvait un régulateur pour le gaz, à gauche j'ai installé le régulateur manométrique. Sur la canalisation du gaz de l'étuve se trouvait un compteur et un régulateur de pression ; sur la canalisation électrique, il y avait 3 enregistreurs : voltmètre, ampèremètre, wattmètre, ainsi que les accessoires nécessaires pour vérifier au potentiomètre les indications de ces instruments. L'installation ainsi faite, l'étuve était chauffée tantôt au gaz, tantôt à l'électricité. La température de l'étuve pendant le chauffage au gaz a oscillé entre 35° et 36°,7 ; la température pendant le chauffage à l'électricité a été constamment de 36°,5. La moyenne de la dépense en gaz a été de 5,100 litres par 24 heures ; la moyenne de la dépense électrique fut de 350 watts si on compte l'énergie totale dépensée dans l'étuve et dans le régulateur, et seulement de 320 watts dans l'étuve seule. Ce qui donne par 24 heures 8,400 ou 7,680 watts-heure.

Prenant le chiffre de 8,400 watts-heure, correspondant à l'énergie totale, on voit qu'on dépense 1 m. c. de gaz ou 1,647 watts-heure pour chauffer cette même étuve à 36°,5. Le gaz coûte à l'Institut Pasteur de Lille 0 fr. 15 le m. c., il suffit donc que le kilowatt-heure lui revienne à 0 fr. 09 pour que les deux modes de chauffage coûtent le même prix. On peut donc conclure que le chauffage électrique est plus avantageux que le

gaz lorsque l'alimentation en électricité des étuves n'entraîne, dans un établissement où on produit soi-même son électricité, qu'un surcroît de dépense d'énergie dans une installation déjà existante pour d'autres usages.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

16me ANNÉE 25 NOVEMBRE 1902 N° 11

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR
LE TRAITEMENT ET LA PRÉVENTION DU NAGANA

Par MM. A. LAVERAN et F. MESNIL

Depuis deux ans, nous poursuivons des recherches sur le Nagana, cette redoutable maladie de la mouche *tsétsé*, qui sévit dans toute l'Afrique centrale; nous avons étudié, au point de vue morphologique, le Trypanosome, *Tr. Brucei*, qui est l'agent pathogène de la maladie [1], et les formes cliniques, très variées, que revêt le Nagana chez les différentes espèces animales [2]; aujourd'hui, nous croyons devoir faire connaître les résultats de nos recherches sur le traitement du Nagana et sur l'immunisation des animaux contre cette maladie, bien que ces résultats soient peu satisfaisants.

Nous avons constaté quelques faits nouveaux qui nous semblent avoir de l'intérêt; nous espérons, d'autre part, que les nombreuses et laborieuses expériences que nous avons faites faciliteront les recherches des observateurs qui, après nous, reprendront l'étude de ces difficiles problèmes.

Après un court historique des recherches antérieures aux nôtres, sur le traitement et la prévention du Nagana et du Surra, nous exposerons :

I. Nos essais de traitement du Nagana avec des produits chimiques ou avec des sérums (sérum humain, sérum des animaux ayant acquis l'immunité pour le Nagana, etc.).

II. Nos essais d'immunisation.

Enfin, nous dirons quelques mots, en terminant, des mesures prophylactiques qui s'imposent contre le Nagana et le Surra.

1. *Société de biologie*, 23 mars 1901, et ces *Annales,* janvier 1902.
2. *Académie de médecine*, 3 juin 1902.

*
* *

Lingard, aux Indes, a expérimenté un grand nombre de produits chimiques pour le traitement du Surra du cheval; le sublimé, l'iode et l'iodure de potassium, le bichromate de potasse, l'iodoforme, la térébenthine, l'acide phénique, les alcaloïdes du quinquina, l'iodure double de potassium et de mercure, la liqueur de potasse ont été employés sans succès.

L'arsenic seul a donné quelques résultats favorables. 21 chevaux ont été soumis à ce moyen de traitement, un seul a guéri. Ce cheval était au 21e jour de la maladie quand on a commencé le traitement; il a reçu 455 grains d'acide arsénieux en 63 jours et de l'iodure de sodium à la dose de 2 drachmes deux fois par jour pendant 62 jours[1]. L'animal put reprendre son service, dans la police montée, au bout de 100 jours; il était en bonne santé 3 ans et 2 mois plus tard.

Lingard conseille de prescrire aux chevaux atteints de Surra l'acide arsénieux pendant 2 mois, à la dose de 12 grains par jour, et ensuite l'iodure double d'arsenic et de mercure pendant 6 mois.

L'iodure double d'arsenic et de mercure employé préventivement n'a pas donné de résultats favorables.

Lingard a employé, sans succès, pour le traitement du Surra : les injections de sérum obtenu en filtrant sur porcelaine un sang très riche en Trypanosomes et les injections sous-cutanées de sérum d'un Bovidé guéri du Surra et ayant acquis l'immunité pour cette maladie[2].

Bruce a expérimenté, au Zoulouland, le traitement arsenical sur des chevaux et sur des ânes atteints de Nagana. Il s'est servi d'une solution d'arsénite de soude qui était administrée à l'intérieur; on donnait en moyenne aux chevaux et aux ânes 12 grains d'acide arsénieux par jour.

Aucun des animaux en traitement n'a guéri. Bruce a constaté seulement que les Trypanosomes disparaissaient temporairement du sang des animaux traités et qu'on observait une amélioration passagère dans leur état.

Des chevaux et un âne saturés d'arsenic ont contracté rapi-

1. Le drachme, = 3gr,888, le grain = 0gr,064.
2. Lingard, *Report on Surra*... Vol. II, part. 1, Bombay, 1899, p. 61.

dement le Nagana quand on les a conduits dans des régions à tsétsé. Chez un chien, l'emploi préventif de l'arsenic a été également sans effet.

Bruce conclut de ses recherches que l'arsenic est tout à fait inutile comme prophylactique du Nagana, mais qu'il rend des services pour prolonger la vie des animaux après que la maladie a commencé[1].

E. R. Rost a préconisé l'emploi des injections de sérum de chèvre pour le traitement du Surra[2]; d'après cet observateur, les Trypanosomes du Surra meurent au bout de 1/2 minute à 2 minutes 1/2 dans le sang additionné de 1 0/0 de sérum de chèvre. Cette assertion n'a pas été vérifiée pour le Surra et, en ce qui concerne le Nagana, nous avons constaté que le sérum de chèvre n'avait pas d'action spéciale sur les Trypanosomes.

D'après le professeur R. Koch, on pourrait atténuer les Trypanosomes du Nagana par des passages d'une espèce animale à des espèces différentes et immuniser les animaux à l'aide de ces Trypanosomes à virulence atténuée[3]. Les faits sur lesquels se base R. Koch pour soutenir cette opinion peuvent être résumés comme il suit.

Les expériences ont été faites à Daressalam (Est africain allemand); le virus a été fourni par un bœuf qui s'était infecté naturellement en traversant des régions à tsétsé.

Le 6 septembre 1897, on inocule avec le sang défibriné du bœuf, riche en Trypanosomes, les animaux suivants : 1 âne de Massaï, 1 vache, 2 veaux, 2 singes, 2 cobayes, 2 rats, 1 chien. L'âne de Massaï, les singes et les cobayes restent en bonne santé; on ne constate chez eux aucun signe d'infection. La vache meurt au bout de 39 jours, les veaux au bout de 41 et 49 jours, les rats au bout de 34 et 52 jours, le chien au bout de 19 jours.

Le 15 octobre 1897, le sang d'un des rats inoculés le 6 septembre est injecté à 2 rats et à un chien; un des rats est trouvé mort 6 jours après l'inoculation, avant l'apparition des Trypanosomes dans le sang; le deuxième rat montre des Trypanosomes 13 jours seulement après l'inoculation et ne meurt

1. D. Bruce, *Rapports sur le Nagana*, 1895-1896.
2. E.-R. Rost, Rapport sur la possibilité de traiter le Surra par des injections d'un sérum antiparasitaire. *Journal of. Path. and Bacter.*, vol VII, p. 285, juin 1901.
3. R. Koch, *Deutsch. Kolonialblatt*, n° 24, 1901.

qu'après 68 jours. Le chien meurt après 42 jours, son sang est utilisé pour le troisième passage.

Le 30 octobre, on inocule avec le sang du chien : 2 chiens, 2 bœufs, 4 ânes de Massaï, et 3 rats. Les chiens meurent au bout de 19 et de 26 jours, les rats au bout de 67, 73 et 80 jours; les ânes ne s'infectent pas.

Tout l'intérêt de l'expérience se concentre, d'après Koch, sur la manière dont se comportent les bœufs. Les Trypanosomes apparaissent, dans le sang de ces animaux, au bout de 10 jours chez l'un et de 13 jours chez l'autre, mais ils disparaissent bientôt; les bœufs ne présentent aucun signe de maladie, et ils survivent; un de ces animaux a été perdu de vue après une année, l'autre vivait encore 3 ans 1/4 après l'inoculation et, inoculé à plusieurs reprises avec du sang riche en Trypanosomes, il ne s'était pas réinfecté; il possédait donc une immunité solide.

Koch conclut, un peu prématurément ce nous semble, de ces observations que la question des inoculations préventives du Nagana est résolue. Nous aurons l'occasion de revenir plus loin sur cette question et de montrer que l'atténuation des Trypanosomes du Nagana par le passage chez des animaux d'espèces différentes est légère, si même elle ne fait pas complètement défaut.

De la guérison des deux bœufs, on ne peut rien conclure; il n'est pas rare, en effet, de voir le Nagana et le Surra des bœufs se terminer spontanément ainsi, et les animaux qui guérissent ont l'immunité comme l'avaient les bœufs de Koch.

Nous devons noter que les Trypanosomes utilisés par Koch pour ses expériences à Daressalam avaient un pouvoir virulent très différent de celui des Trypanosomes sur lesquels nous avons expérimenté [1]. Alors que les rats inoculés par nous mouraient en 5 jours, les rats inoculés par Koch ont survécu 34, 52, 68, 67, 73 et 80 jours; un chien est mort au bout de 42 jours, tandis que la durée moyenne de la maladie, chez nos chiens, n'a été que de 10 j. 1/2. Les ânes, les singes, ainsi que 2 cobayes inoculés par Koch, ont résisté, tandis que tous les animaux de ces espèces que nous avons inoculés sont morts; on

1. Ces Trypanosomes sont les mêmes que ceux qui ont servi aux recherches de MM. Kanthack, Durham et Blandford : ils proviennent du Zoulouland.

peut objecter que les ânes de Massaï et les singes sur lesquels Koch a expérimenté étaient plus résistants au Nagana que les animaux que nous avons eus à notre disposition à Paris; mais l'objection ne paraît valable ni pour les rats, ni surtout pour les cobayes. On est amené ainsi à se demander s'il n'y a pas plusieurs variétés de Nagana en Afrique.

D'après Schilling[1], les bœufs sont susceptibles d'acquérir l'immunité et, à la suite d'injections répétées de sang à Trypanosomes, le sérum de ces animaux acquiert des propriétés microbicides pour le Trypanosome du Nagana. L'auteur cite l'expérience suivante : à un taureau ayant eu une atteinte de Nagana et paraissant bien guéri, on injecte sous la peau 19 c. c. de sang défibriné d'un cheval ayant de nombreux Trypanosomes; le 9e jour après l'injection, on trouve, chez le taureau, de rares Trypanosomes qui ont disparu le 12e jour; on pratique une nouvelle injection de sang à Trypanosomes dans le péritoine; on constate alors que le sérum du taureau a une action spécifique *in vitro* sur les Trypanosomes du Nagana, qui s'immobilisent en 30 et même en 21 minutes, quand on mélange ce sérum à du sang à Trypanosomes.

L'expérience suivante de Schilling semble favorable, au premier abord, à l'hypothèse de l'atténuation des Trypanosomes par le passage entre espèces différentes.

Trois veaux sont inoculés avec l'exsudat péritonéal d'un chien nagané (troisième passage de chien à chien); les Trypanosomes apparaissent dans le sang des veaux, mais pour disparaître rapidement, au bout de 21, 12 et 15 jours. Les trois animaux sont envoyés dans une région à tsétsé; un d'eux meurt pendant le voyage, les deux autres se portaient bien encore au bout de deux mois.

Il est évident, pour tous ceux qui connaissent l'évolution du Nagana chez les Bovidés, que les 2 veaux n'ont pas été suivis assez longtemps pour qu'on puisse conclure.

Dans une lettre postérieure, Schilling déclare que les difficultés à vaincre pour combattre le Surra sont plus grandes qu'il ne le croyait[2].

Pendant la grave épizootie de Surra qui a régné en 1901 à

1. SCHILLING, *Centralbl. f. Bakter.*, Erste Abteil., 1902. Bd. XXXI, S. 452.
2. *Kolonial-Wirtschaftliches Komitee*, Berlin, séance du 2 juin 1902.

l'île Maurice, un grand nombre de médications ont été employées vainement pour combattre le Surra chez les Bovidés et chez les Équidés.

M. le Dr Alfred Lesur a employé sans succès : les injections hypodermiques et intra-veineuses de quinine, la liqueur de Fowler, le cacodylate de soude, l'arrhénal.

M. Deixonne, vétérinaire à Maurice, a eu recours sans succès à l'acide arsénieux, au cacodylate de soude, à l'arrhénal et aux injections intra-veineuses de sublimé aux doses conseillées par Baccelli dans la fièvre aphteuse[1].

Aux Philippines, où le Surra règne sur les Équidés, le bureau sanitaire conseille les injections intra-veineuses de liqueur de Fowler ; les parasites du sang se trouvent ainsi presque toujours détruits ; les animaux traités paraissent en bonne santé ; mais, jusqu'à présent, on n'obtient pas de guérison définitive[2].

I

TRAITEMENT

1° *Essais de traitement par différents produits chimiques.*

Acide arsénieux, arsénite de soude. — Il était indiqué d'employer les préparations arsenicales qui avaient donné à Lingard et à Bruce quelques résultats favorables dans le traitement du Surra ou du Nagana.

Nous avons expérimenté le traitement arsenical principalement chez le rat, chez la souris et chez le chien.

Nous employons la solution suivante pour le traitement des rats :

Acide arsénieux	1 gramme.
Carbonate de soude	1 —
Eau distillée	500 grammes.

Faire bouillir.

Les seringues de 1 c. c. sont graduées d'ordinaire en 20 divisions, ce qui donne 0mgr,1 d'acide arsénieux par division.

Pour le traitement des souris, il est bon d'étendre cette solution à moitié ; pour le traitement des chiens, on fera usage au contraire d'une solution plus forte.

Au début, nous avons employé la solution arsenicale en

1. A. Laveran, *Académie de Médecine*, 28 octobre 1902.
2. Salmon et Stiles, Emergency Report on Surra, *U. S. Dep. of. Agriculture, Bureau of anim. Industry*, bulletin n° 42, 1902, p. 94.

injections intra-veineuses chez le chien, mais nous avons constaté que les injections sous-cutanées donnaient des résultats aussi favorables que les injections intra-veineuses et, dès lors, nous avons eu recours exclusivement à la méthode hypodermique qui est plus commode et qui est seule applicable chez les petits animaux.

Les injections arsenicales faites sous la peau du ventre des rats et des souris donnent lieu souvent à des abcès ; on évite cet inconvénient en pratiquant les injections dans les muscles de la cuisse. La peau est épilée au préalable et lavée au sublimé. L'injection est un peu douloureuse et provoque, chez les rats et les souris, un malaise évident, qui persiste parfois plusieurs heures.

L'action de l'acide arsénieux sur les Trypanosomes du Nagana est très remarquable, à condition qu'on emploie des doses suffisantes du médicament. Pour le rat et pour la souris, nous avons constaté qu'il fallait employer $0^{mgr},1$ d'acide arsénieux pour 20 grammes d'animal.

Soit un rat de 100 grammes infecté de Nagana et ayant de nombreux Trypanosomes dans le sang; on lui injecte dans les muscles de la cuisse $0^{mgr},5$ d'acide arsénieux. 1 à 2 heures après l'injection, l'examen du sang ne révèle pas encore de résultat appréciable; mais, au bout de 5 à 6 heures, on constate une diminution dans le nombre des parasites; au bout de 24 heures, on ne trouve plus de Trypanosomes dans le sang, ou du moins ces parasites sont devenus extrêmement rares.

Lorsque les Trypanosomes sont très nombreux dans le sang, au moment où l'on commence le traitement, la disparition des parasites est moins rapide; elle n'a lieu qu'en 36 ou 48 heures; parfois même, une deuxième injection arsenicale est nécessaire. Malheureusement, cette disparition des Trypanosomes du sang n'est que temporaire; au bout dè 48 heures, de 3 ou 4 jours au plus, les parasites reparaissent; d'abord en petit nombre, ils ne tardent pas à se multiplier si l'on n'intervient pas de nouveau. En pratiquant des injections arsenicales successives à 2 ou 3 jours d'intervalle, on arrive à prolonger beaucoup la vie des animaux: *on ne les guérit jamais.* Il arrive un moment où le traitement arsenical n'est plus supporté : il se produit de la diarrhée, de l'amaigrissement, des névrites, des œdèmes aux points d'inoculation;

les animaux meurent du Nagana si l'on interrompt le traitement, d'arsenicisme, si on ne l'interrompt pas.

Alors que les rats infectés de Nagana et non traités meurent au bout de 5 jours en moyenne, les rats traités par l'arsenic peuvent vivre deux mois ou deux mois et demi; les maxima de survie que nous avons observés ont été de 78 et 79 jours.

Dans l'expérience qui est résumée ci-dessous et qui a porté sur 6 rats, la durée moyenne de la maladie chez les 5 rats traités a été de 58 j. 1/2, alors que le rat témoin, non traité, est mort en moins de 5 jours.

Le 18 novembre 1901, 5 rats (blanc et noir) sont inoculés sous la peau avec du sang dilué de souris contenant de nombreux Trypanosomes.

Le 21 novembre (matin), les 6 rats ont des Trypan. assez nombreux dans le sang. L'un deux (*rat I*, poids 175 gr.) n'est pas traité; les Trypan. continuent à augmenter et il meurt dans la nuit du 22 au 23. *Durée de la maladie, moins de 5 jours.*

Les 5 autres reçoivent sous la peau, le 21 novembre, à 5 heures du soir, une dose calculée à raison de $0^{mgr},1$ d'acide arsénieux par 20 grammes d'animal; ils reçoivent tous les 2 jours, pendant un mois, une dose semblable ou légèrement supérieure, puis la même dose ou une dose un peu inférieure, tous les 3 jours jusqu'à la mort. Les Trypan., absents du sang chez les cinq rats, dès le 22 novembre au matin, ne reparaissent (avec une exception) que dans la dernière semaine de décembre; mais, à partir de ce moment, ils sont rarement absents du sang, malgré les nouvelles injections arsenicales; ils vont en augmentant lentement et l'animal finit par succomber. A l'autopsie, la rate est hypertrophiée, mais pas plus que celle des rats non traités.

Le *rat II* (125 gr.) a de nouveau des Trypan. dans le sang le 30 décembre et meurt le 11 janvier, avec les symptômes convulsifs caractéristiques du Nagana des rats. *Durée de la maladie*, 54 *jours*.

Le *rat III* (190 gr.) a de nouveau des Trypan. dans le sang les 24 décembre, 9 et 17 janvier; ils sont absents dans les intervalles. Du 17 janvier jusqu'à la mort (5 février), les Trypan. sont toujours présents. *Durée de la maladie*, 79 *jours*.

Le *rat IV* (160 gr.) a de nouveau des Trypan. dans le sang le 24 décembre; ils restent présents dans le sang et vont en augmentant jusqu'à la mort (9 janvier). *Durée de la maladie*, 51 *jours*.

Le *rat V* (120 gr.) a de nouveau des Trypan. dans le sang le 24 décembre; ils restent presque constamment présents dans le sang, vont en augmentant à partir du 15 janvier jusqu'à la mort (23 janvier). *Durée de la maladie*, 66 *jours*.

Chez le *rat VI* (145 gr.), les Trypan. reparaissent dès le 29 novembre; mais ils sont de nouveau absents du 3 au 24 décembre, présents du 24 jusqu'à la mort (30 déc.). *Durée de la maladie*, 42 *jours*.

Chez les souris, le traitement arsenical donne les mêmes résultats que chez les rats; il est seulement d'un emploi plus difficile, les doses efficaces d'acide arsénieux étant encore plus voisines que pour le rat des doses toxiques. Chez des souris de 14 à 20 grammes, on peut injecter $0^{mgr},1$ d'acide arsénieux.

Chez le chien, le traitement arsenical nous a donné de moins bons résultats que chez le rat; ce traitement prolonge la vie d'une manière évidente, mais dans une proportion bien moindre que chez les rats.

Nous avons injecté aux chiens de $2^{mgr},5$ à $3^{mgr},5$ d'acide arsénieux par kilogramme d'animal.

Les premières injections arsenicales font disparaître plus ou moins complètement les Trypanosomes du sang des animaux traités, mais les Trypanosomes reparaissent bientôt, et les animaux meurent, malgré des injections répétées; l'acide arsénieux perd son efficacité plus rapidement, semble-t-il, chez le chien que chez le rat.

Sur 9 chiens infectés de Nagana[1] et traités par l'acide arsénieux, la durée moyenne de la maladie a été de 25 jours 1/2; la durée maximum a été de 46 jours. Chez les chiens non traités, la durée de la maladie est de 6 à 16 jours (moyenne 10 j. 1/2.)

Dans des recherches en cours, nous avons constaté que l'acide arsénieux était également microbicide pour les Trypanosomes du Mal de caderas; il n'exerce aucune action sur les infections des rats dues au *Tr. Lewisi*.

Mode d'action de l'acide arsénieux sur les Trypanosomes du Nagana. — Lorqu'on mélange *in vitro* du sang riche en Trypanosomes, étendu d'eau citratée, à la solution arsenicale, les Trypanosomes sont tués rapidement. Si, par exemple, à 15 gouttes de sang riche en Trypanosomes, on ajoute 1 goutte de la solution d'acide arsénieux à 2 pour 1000, on constate que les Trypanosomes sont immobilisés au bout de 15 à 20 minutes, parfois plus rapidement, tandis que, dans des préparations témoins (sang non additionné de solution arsenicale), la mobilité persiste.

L'acide arsénieux est donc toxique pour le Trypanosome du Nagana *in vitro*, mais on ne pouvait pas en conclure que, *in vivo*, l'action était la même; certaines substances très toxiques *in vitro*

1. Par un virus qui ne provenait pas d'un Ruminant.

pour le Trypanosome du Nagana, le formol par exemple, sont en effet sans action *in vivo*.

Pour étudier l'action *in vivo* de l'acide arsénieux sur le Trypanosome du Nagana, nous avons fait des prises successives de sang chez les rats naganés, après avoir pratiqué chez eux des injections arsenicales. Le sang était examiné à l'état frais et après coloration par le procédé ordinaire. Nous avons observé, à plusieurs reprises, des faits semblables à ceux relatés dans l'expérience qui suit.

Le 27 octobre 1901, à 9 heures du matin, on injecte sous la peau d'un rat ayant des Trypan. très nombreux dans le sang, 0 mgr, 6 d'acide arsénieux.

L'examen du sang frais fait 1 heure après l'injection montre des Trypan. encore très nombreux, bien mobiles. Pas de leucocytose marquée. Sur une préparation de sang colorée, on trouve quelques Trypan. déformés, en boules, au milieu de Trypan. d'aspect normal.

Examen du sang fait 2 heures après l'injection. Sang frais : Trypan. encore très nombreux, mouvements moins vifs qu'à 9 heures du matin. Pas de leucocytose marquée. Trypan. déformés non rares. Sang desséché et coloré : formes d'involution des Trypan. au milieu de Trypan. encore intacts. Trypan. en boules, Trypan. dont le protoplasme a disparu plus ou moins complètement, ou qui même sont réduits au flagelle.

Examen du sang fait 5 heures après l'injection. Le nombre des Trypan. a sensiblement diminué; mouvements ralentis. Formes d'involution des Trypan. Pas de leucocytose marquée.

Examen du sang fait 7 heures après l'injection. Trypan. peu nombreux. Formes d'involution. Beaucoup de Trypan. renferment de nombreuses granulations chromatiques.

28 octobre au matin. On ne trouve plus de Trypan.

On voit que chez ce rat nagané, traité par l'acide arsénieux, on trouvait, 2 heures après l'injection, des formes d'involution des Trypanosomes; au bout de 4 à 5 heures, la diminution du nombre des Trypanosomes était sensible; au bout de 24 heures, les Trypanosomes avaient disparu.

Les formes d'involution chez les rats traités par l'arsenic sont les mêmes que celles qu'on observe lorsque du sang riche en Trypanosomes est soumis à une température de 41° à 42° pendant quelque temps : les mouvements des Trypanosomes se ralentissent, les parasites se déforment et deviennent granuleux, ils prennent enfin une forme globuleuse très caractéristique; à une phase plus avancée de l'altération, le protaplasme disparaît,

ainsi que le noyau et l'on trouve, dans les préparations colorées, des flagelles isolés, auxquels adhèrent encore, assez souvent, les centrosomes.

Dans l'expérience relatée plus haut, on n'a pas noté de leucocytose; dans d'autres cas, une leucocytose légère est signalée.

Nous avons cherché vainement à voir des englobements de Trypanosomes mobiles par les leucocytes, mais nous avons vu souvent des leucocytes qui avaient englobé des restes des Trypanosomes; on distinguait parfois le noyau et le centrosome des Trypanosomes englobés.

Nous croyons pouvoir conclure que l'acide arsénieux est microbicide pour les Trypanosomes du Nagana [1] et que les leucocytes n'englobent que les Trypanosomes morts ou en voie avancée d'involution.

Nous avons cherché si la sensibilité des Trypanosomes pour l'arsenic diminuait, *in vitro*, chez les rats traités depuis quelque temps déjà par ce médicament. En mélangeant la solution arsenicale aux mêmes doses : 1° à du sang de rat nagané traité depuis longtemps par l'arsenic; 2° à du sang de rat nagané non traité, nous n'avons pas observé de différence notable ; les Trypanosomes étaient détruits, dans les deux cas, aussi rapidement.

Pourquoi l'acide arsénieux, bien qu'il exerce une action microbicide manifeste sur les Trypanosomes du Nagana, ne guérit-il jamais les animaux naganés? Les Trypanosomes qui se trouvent dans le sang de la grande circulation sont détruits ; mais, dans certains *coins* de l'organisme, ils échappent évidemment à l'action du médicament. Dès que la majeure partie de l'acide arsénieux a été éliminée ou fixée par les tissus, ces Trypanosomes passent de nouveau dans le sang et s'y multiplient rapidement.

On pouvait supposer que la rate servait de refuge aux Trypanosomes du Nagana comme aux Hématozoaires du Paludisme. L'expérience suivante prouve que le traitement arsenical ne donne pas de meilleurs résultats, chez les animaux dératés, que chez les autres.

1. L'action de l'acide arsénieux sur les Trypanosomes du Nagana, du Surra et du Mal de caderas est comparable à celle de la quinine sur l'Hématozoaire du Paludisme. Dans les deux cas, il y a action directe des médicaments sur les Protozoaires parasites.

La rate est enlevée à 3 rats (blanc et noir), le 21 novembre 1901. Le 28 novembre, ces rats, qui sont bien guéris et en bon état, sont inoculés avec du sang à Trypan. du Nagana.

RAT I (témoin). — Poids : 119 grammes. — 30 novembre, Trypan. assez nombreux; 1er décembre, très nombreux. Trouvé mort, le 2 décembre au matin. *Durée de la maladie, moins de 4 jours.*

RAT II. — Poids : 120 grammes. — 30 novembre, Trypan. assez nombreux; 1er décembre, très nombreux. injection 0mgr,6 acide arsénieux; 2 décembre, 0 Trypan. — Même dose d'acide arsénieux, tous les 2 jours, jusqu'au 14 décembre. Ce jour-là, Trypan. non rares : on donne 0mgr,7 d'acide arsénieux, ainsi que les 16 et 18 décembre, puis on revient à la dose de 0mgr,6 tous les 2 jours. — Trypan. très rares du 18 décembre au 2 janvier 1902. A partir du 3 janvier, Trypan. nombreux, puis très nombreux. Diarrhée, faiblesse générale, amaigrissement (poids : 109 gr.); on est obligé d'abaisser à 0,5 la dose d'acide arsénieux. — Trouvé mort le 8 janvier. *Durée de la maladie 41 jours.*

RAT III. — Poids : 103 grammes. — 30 novembre, Trypan. assez nombreux, 1er décembre très nombreux, ars. 0mgr,5; 2 décembre, assez rares. ars. 0mgr,5; 3 décembre, 0 Trypan.; 4 décembre, 0 Trypan. ars. 0mgr,5; 6 décembre, poids : 112 grammes, Trypan. nombreux, ars. 0mgr,6. Dose de 0mgr,6, tous les 2 jours, jusqu'au 28 décembre; 31 décembre, un peu de diarrhée; ars. 0mgr,5, tous les 2 jours. Trouvé mort, le 15 au matin. *Durée de la maladie, 47 jours.*

CACODYLATE DE SOUDE. — Ce médicament est très peu actif *in vitro;* 30 gouttes de sang riche en Trypanosomes sont mélangées à 10 gouttes d'une solution de cacodylate de soude à 5 0/0; au bout de 3 heures, il y a encore des Trypanosomes mobiles. Les injections hypodermiques de cacodylate de soude faites chez des rats naganés n'ont eu aucune influence sur la marche de la maladie.

ARRHÉNAL. — Les expériences suivantes faites, la première sur des chiens, la deuxième sur des rats naganés, montrent que l'arrhénal est sans action sur les Trypanosomes du Nagana; chez les animaux soumis à cette médication, la mort n'est même pas retardée, comme cela a lieu à la suite du traitement par l'acide arsénieux.

Trois chiens sont inoculés, le 3 juillet 1902, avec du sang de rat nagané. Le traitement est commencé le 6 juillet; le 1er chien (poids : 12 kilogr.) reçoit journellement 20mgr. d'arrhénal; le 2e (poids : 8 kilogr.), 40mgr; le 3e (poids : 7 kil. 500), 80mgr. L'évolution de la maladie est normale et les 3 chiens succombent respectivement 5 j. 1/2, 11 j. 1/2 et 5 j. 1/2 après l'inoculation de sang virulent.

Cinq rats sont inoculés le 28 juin 1902 sous la peau avec du virus. Le

traitement est commencé le 1er juillet; le 1er rat (87 gr.) reçoit journellement 1mgr. d'arrhénal, le 2e (94 gr.), 2mgr, le 3e (64 gr.), 4mgr., le 4e (92 gr.), 8mgr. Les Trypan. continuent à augmenter dans le sang, et les rats meurent respectivement 4 j. 1/2, 6 j., 4 j. 1/2 et 6 j. 1/2 après l'inoculation du virus. Le 5e rat qui sert de témoin meurt en 4 j. 1/2.

Pendant l'épizootie de Surra de l'île Maurice, l'arrhénal a été employé également sans succès pour le traitement des Bovidés et des Equidés.

Sublimé. — Actif *in vitro* sur les Trypanosomes, le sublimé, employé en injections hypodermiques, pour le traitement des animaux naganés, n'a pas donné de résultats favorables; on atteint les doses toxiques pour les animaux naganés, avant que l'action se fasse sentir sur les Trypanosomes.

Iodure double d'arsenic et de mercure. — Actif *in vitro*, ce médicament ne nous a pas donné de résultats favorables pour le traitement des animaux naganés.

Eau iodée. — S'est montrée très peu active, même *in vitro*, probablement parce que l'iode est fixé très rapidement par l'albumine du sang.

Iodure de potassium. — Sans action apparente *in vitro* sur les Trypanosomes; sans action sur le cours de la maladie chez les animaux naganés.

Sels d'argent. — Nous avons employé le lactate d'argent, le fluorure d'argent ou tachiol et le caséinate d'argent ou argonine. Les sels d'argent, actifs *in vitro* sur les Trypanosomes, n'ont montré aucune efficacité dans le traitement du Nagana; ils ont, en outre, le grave inconvénient, lorsqu'on les emploie par la méthode hypodermique, de provoquer des douleurs extrêmement vives, des œdèmes et des phlegmons.

L'expérience suivante montre que le fluorure d'argent, très vanté comme microbicide par des auteurs italiens[1], est sans efficacité dans le traitement du Nagana.

Trois rats sont inoculés, le 2 juillet 1902, sous la peau avec du sang de rat nagané; le 4, les Trypan. sont rares dans le sang. Le 1er rat reçoit 1mgr. de fluorure sous la peau, le 2e, 2mgr., le 3e, 4mgr. L'injection est très douloureuse. Le lendemain, les 3 rats ont des Trypan. nombreux dans le sang; il s'est développé un phlegmon au point d'inoculation du sel d'argent. Le 6 au matin, les 3 rats sont trouvés morts.

1. *The Lancet*, 8 février 1902, p. 393

Quinine. — Les sels de quinine sont très peu actifs, *in vitro*, sur les Trypanosomes du Nagana; employés sous forme d'injections hypodermiques, chez des animaux naganés, ils ne nous ont paru avoir aucune influence sur l'évolution de la maladie.

Aldéhyde formique. — Le formol, même en solution très diluée, tue rapidement *in vitro* les Trypanosomes du Nagana; injecté sous la peau ou dans les veines, il se montre inactif, apparemment parce que l'aldéhyde formique est fixée trop rapidement.

Bleu de toluidine. — Lorsqu'on mélange une goutte de sang riche en Trypanosomes à une goutte de solution de bleu de toluidine à 1 0/0, on constate que les mouvements des Trypanosomes se ralentissent rapidement; au bout de 4 à 5 minutes, les Trypanosomes sont en général immobiles et ils se colorent en bleu. L'action est moins rapide si l'on ajoute au sang une proportion moindre de bleu. L'expérience prouve que la virulence des Trypanosomes qui ont subi pendant un laps de temps convenable l'action du bleu de toluidine est atténuée dans une certaine mesure. Nous y reviendrons plus loin.

Bleu de méthylène. — Il exerce sur les Trypanosomes du Nagana une action analogue à celle du bleu de toluidine, mais moins rapide.

Les essais de traitement du Nagana par le bleu de toluidine ou par le bleu de méthylène, en injections intra-veineuses ou sous-cutanées, ne nous ont donné aucun résultat favorable.

Parmi les médicaments que nous avons expérimentés, sans succès, dans le Nagana, nous citerons encore : l'*acide phénique*, l'*acide salicylique*, le *chinosol*, l'*essence d'ail*, la solution de *chlorure de chaux*, le *chloral*.

2° *Essais de sérothérapie.*

Nos recherches ont porté sur l'action des sérums normaux et du sérum provenant d'animaux ayant acquis l'immunité contre le Nagana. Parmi les sérums normaux, le sérum humain a seul montré des propriétés microbicides pour *Tr. Brucei*.

Sérum humain. — Injecté à dose suffisante aux animaux naganés, le sérum humain exerce sur la marche de la maladie une action manifeste [1] : les Trypanosomes disparaissent du sang

1. A. Laveran, *Acad. des Sciences*, 1er avril 1902.

au moins d'une façon temporaire, l'évolution de la maladie est retardée, parfois même, on obtient des guérisons complètes.

Le sérum fourni par les adultes est beaucoup plus actif que le sérum des nouveau-nés [1].

Le sérum humain conserve longtemps son activité quand il a été recueilli avec pureté ; le sérum impur, dans lequel se développent des champignons ou des bactéries, devient rapidement inactif.

La sérosité pleurale est moins active que le sérum du sang de la saignée; la sérosité de l'ascite est encore moins active que la sérosité pleurale.

Nos expériences sur le traitement du Nagana par le sérum humain ont porté presque exclusivement sur des rats et sur des souris ; il n'est pas facile, en effet, de se procurer du sérum humain à une époque où la saignée est tombée dans le discrédit, et nous devions ménager les petites quantités de sérum que nous réussissions à nous procurer [2] ; quelques expériences ont été faites, cependant, sur des chiens.

Chez les souris de 10 à 20 gr., la dose de sérum humain employée a été en général de 1/2 à 1 c. c.; chez les rats de 50 à 100 gr., elle a été de 1 à 2 c. c.

Si, à une souris de 20 gr. environ, ayant des Trypanosomes du Nagana dans le sang, on injecte 1/2 à 1 c. c. de sérum humain, on constate, au bout de 24 à 36 heures, que les Trypanosomes ont disparu du sang. Il en est de même si, chez un rat nagané de 100 grammes environ, on injecte 1 à 2 c. c. de sérum humain.

La disparition des Trypanosomes est moins rapide quand les parasites sont très nombreux au moment où l'injection est pratiquée; il faut tenir compte aussi de la différence d'activité des sérums. Nous avons eu des sérums qui, à la dose de 1/4 et même 1/10 de c. c., faisaient disparaître les Trypanosomes du sang de souris de 15 grammes.

Il arrive quelquefois que les Trypanosomes ne reparaissent

1. Ce fait est évidemment à rapprocher de ceux signalés récemment par Halban et Landsteiner (*Münch. med. Woch.*, 1902, n° 12) qui ont montré que le sérum maternel est plus hémolytique, plus bactéricide, etc., que le sérum fœtal.

2. Nous remercions MM. les Drs Lesage et Weinberg ainsi que Mlle Roze, sage-femme en chef à la clinique Baudelocque, qui, avec une grande obligeance, nous ont fourni du sérum humain pour ces expériences.

pas, mais ce sont là des exceptions. Bien que nous ayons traité par le sérum humain un grand nombre de souris et de rats naganés, nous n'avons noté que quatre cas de guérison chez des souris, après une ou deux injections. Voici le résumé de ces quatre observations :

1° Une souris grise, du poids de 11 gr., est inoculée le 22 mars 1902, dans le péritoine, avec du sang d'un animal nagané. Le 25 mars, les Trypan. sont assez nombreux dans le sang. On injecte un demi centimètre cube de sérum humain. Le 26 mars, les Trypan. ont disparu et ils ne reparaissent pas. Le 19 avril (au bout de 25 jours), la souris, considérée comme guérie, est inoculée à nouveau avec du sang à Trypan., dans le but de constater si elle a acquis l'immunité. Le 22 avril, les Trypan. reparaissent dans le sang ; la souris est soumise de nouveau au traitement par le sérum humain, qui ne produit plus que des disparitions temporaires des Trypan. La souris meurt le 13 août.

2° Une souris ayant des Trypan. assez nombreux reçoit un quart de centimètre cube de sérum humain ; les Trypan. disparaissent du sang pendant 6 jours ; une deuxième injection de 1 c. c. de sérum fait disparaître d'une façon définitive les Trypan.. Au bout de 30 jours, la souris, considérée comme guérie, est inoculée à nouveau avec le sang d'un animal nagané, et cette inoculation est suivie d'une nouvelle infection.

3° Une souris ayant des Trypan. non rares reçoit un demi centimètre cube de sérum humain ; les Trypan. disparaissent et ne reparaissent pas.

4° Une souris ayant des Trypan. assez nombreux dans le sang reçoit un demi-centimètre cube de sérum humain ; les Trypan. disparaissent pendant 7 jours ; une deuxième injection de 1 c. c. fait disparaître les Trypan. et, cette fois, d'une manière définitive.

En règle générale, le sérum humain ne fait disparaître que d'une façon temporaire les Trypanosomes ; après un laps de temps assez variable, les parasites reparaissent, ce qui nécessite des interventions successives.

Chez les souris et les rats naganés, à la suite d'une injection de sérum humain, les Trypanosomes disparaissent souvent pendant 4 à 8 jours ; chez quelques-unes de nos souris traitées par le sérum humain, les Trypanosomes ont disparu du sang pendant 12 et même 18 et 19 jours.

Lorsque les Trypanosomes ont reparu dans le sang d'un animal traité, ils pullulent de nouveau rapidement, comme chez des animaux non traités, et la mort arriverait bientôt, si l'on n'intervenait pas de nouveau.

On peut pratiquer ainsi, chez un animal nagané, une série d'injections de sérum humain et prolonger de beaucoup son

existence: il est à noter que, dans les cas où la guérison a été obtenue, c'est à la suite d'une seule injection ou de deux injections: jamais les animaux traités pendant longtemps n'ont guéri.

On pouvait prévoir que le sérum humain injecté à plusieurs reprises à un animal nagané perdrait de son activité sur les Trypanosomes; il en est bien ainsi, mais la diminution d'activité ne se produit qu'à la longue, si bien qu'on peut traiter un animal avec succès pendant deux et trois mois.

En général, chez les animaux traités par le sérum humain, nous avons attendu que les Trypanosomes reparaissent dans le sang pour pratiquer une nouvelle injection; dans quelques cas, nous avons fait des injections tous les 2 ou 3 jours sans attendre que les Trypanosomes reparaissent. Les résultats définitifs n'ont pas été meilleurs.

Les injections de sérum humain sont très bien supportées; nous avons injecté jusqu'à 2 c. c. de sérum à une souris de 15 grammes, sans produire d'accidents.

Les injections étaient faites, chez les rats et les souris, sous la peau ou dans les muscles des cuisses, avec les précautions antiseptiques ordinaires.

Lorsqu'on a à sa disposition du sérum humain de bonne qualité, on peut facilement prolonger la vie des souris et des rats naganés pendant deux mois, alors que les animaux témoins, non traités, meurent en 4 à 5 jours. Dans quelques cas, les animaux traités ont survécu pendant trois mois.

En alternant l'emploi de l'acide arsénieux et celui du sérum humain, nous avons obtenu des résultats encore plus favorables: un rat a survécu 127 jours, une souris 103 jours, mais nous n'avons pas obtenu de guérisons avec l'emploi alternatif ou même simultané des deux médications.

Dans des recherches en cours, nous avons constaté que le sérum humain était aussi actif dans le Mal de caderas que dans le Nagana; il ne nous a pas paru microbicide pour le Trypanosome vulgaire des rats, *Tr. Lewisi*.

Mode d'action du sérum humain — Il est difficile d'étudier *in vitro* l'action du sérum humain sur les Trypanosomes du Nagana, parce que les mouvements de ces Trypanosomes se ralentissent assez rapidement. Lorsqu'on mélange du sang riche en Trypanosomes, par parties égales, à du sérum humain, on

constate, au bout de 1/2 heure ou 1 heure, que les mouvements des Trypanosomes sont ralentis et, en général, au bout de 2 à 3 heures, que les Trypanosomes sont immobiles; mais les choses se passent à peu près de même dans le sang qui n'a pas été mélangé à du sérum humain. L'action du sérum humain sur les Trypanosomes n'est pas assez rapide pour être étudiée, comme celle de l'acide arsénieux, *in vitro*.

Le sérum humain n'agglutine pas les Trypanosomes du Nagana, alors que les sérums de cobaye, de chèvre et surtout de porc, qui n'ont aucune propriété curative, donnent lieu à de belles agglutinations. On voit ici, une fois de plus, que le pouvoir agglutinant est indépendant du pouvoir microbicide.

En examinant avec soin le sang des animaux traités par le sérum humain, on peut se rendre compte du mode d'action du sérum. L'examen doit être fait, à plusieurs reprises, dans les 24 heures qui suivent l'injection de sérum, chez un animal ayant de nombreux Trypanosomes dans le sang.

Pendant les premières heures après l'injection, les Trypanosomes gardent leur aspect normal; au bout de 4 à 5 heures, on constate dans le sang frais et, mieux encore, sur les préparations de sang fixé et coloré, que beaucoup de Trypanosomes sont déformés, en têtards ou en boules; le corps des Trypanosomes tend à devenir sphérique. A une phase plus avancée, le protoplasme et le noyau des Trypanosomes en voie d'involution disparaissent. Les altérations que subissent les Trypanosomes sont, comme on voit, les mêmes que celles qu'on observe chez les animaux naganés, traités par l'acide arsénieux.

Il n'y a pas de leucocytose marquée; on trouve des leucocytes qui contiennent des restes reconnaissables (par exemple noyau et centrosome) des Trypanosomes, mais la phagocytose ne paraît s'exercer que sur les Trypanosomes morts ou en voie d'involution avancée.

Le sérum humain a donc, sur les Trypanosomes du Nagana, une action microbicide analogue à celle de l'acide arsénieux.

Le sérum humain, chauffé pendant 1 heure à 56°, conserve environ la moitié de son activité; il suffit d'augmenter un peu les doses pour obtenir encore de bons résultats. Une souris traitée uniquement avec du sérum chauffé à 56° a vécu 43 jours.

Le sérum humain, chauffé à 62°, perd la plus grande partie de son activité.

Il ne paraît pas douteux qu'il existe une étroite relation entre l'immunité de l'homme pour le Nagana et l'action microbicide du sérum humain sur *Tr. Brucei*; le principe actif du sérum émane vraisemblablement des leucocytes. On s'explique ainsi que le sérum soit plus efficace que la sérosité pleurale et que la sérosité de l'ascite, très pauvre en leucocytes, soit à peu près inactive. Dans une expérience, le plasma humain citraté s'est montré très peu actif, en comparaison du sérum; mais on conçoit que le plasma humain puisse contenir assez de principes actifs pour protéger l'organisme contre l'invasion des Trypanosomes, sans qu'il ait une activité suffisante pour être curatif quand il est injecté aux animaux et dilué dans une masse relativement grande de plasma inactif.

Peut-être, aussi, la substance microbicide du sérum humain est-elle, dans le sang de l'homme, uniquement renfermée dans les leucocytes, les rendant ainsi capables de détruire les Trypanosomes du Nagana.

Il était intéressant de savoir si des injections répétées de sérum humain, faites chez un animal nagané, ne donnaient pas lieu à la formation d'un anticorps qui neutralisait à la longue le principe actif du sérum. L'expérience suivante ne confirme pas cette hypothèse.

Un rat de 209 grammes, inoculé de Trypan. le 6 mai, reçoit, du 8 au 22 mai, 7 inoculations, chacune de 2 c. c. de sérum humain. Les dernières inoculations ne faisant plus disparaître les Trypan. du sang, le rat est saigné. Son sérum, employé aux doses respectives de 1/2 et de 1 c. c. en mélange avec 1/2 c. c. de sérum humain, chez des souris de 15 grammes environ, n'empêche nullement l'action du sérum humain. La disparition des Trypan. du sang a lieu dans les mêmes conditions que chez les souris qui reçoivent le sérum humain non mélangé de sérum de rat.

Sérum normal d'origine animale. — Le sérum d'aucun anima ne possède une activité comparable à celle du sérum humain sur les Trypanosomes du Nagana. Les sérums suivants, injectés à des rats ou à des souris naganés, ne nous ont donné que des résultats négatifs : sérum de poule ou d'oie, sérum de cheval, de mouton, de chèvre, de porc.

Le singe étant, dans l'échelle des êtres, l'animal le plus voisin de l'homme, il était intéressant de comparer l'action du

sérum de singe sur les Trypanosomes du Nagana à celle du sérum humain; le sérum d'un Cercopithèque s'est montré tout à fait inactif, ce qui est d'accord avec la grande réceptivité des singes de ce groupe pour le Nagana; nous regrettons de n'avoir pas pu poursuivre cette expérience sur des singes appartenant au groupe des Anthropoïdes.

Sérum d'animaux réfractaires au Nagana, ayant reçu des injections répétées de sang riche en *Tr. Brucei*. — Nous avons injecté à plusieurs reprises à des oiseaux (oie, poule) du sang riche en Trypanosomes; le pouvoir curatif du sang des oiseaux ainsi traités s'est toujours montré nul.

Sérum d'animaux ayant acquis l'immunité pour le Nagana. — Le Nagana, qui est toujours mortel pour un grand nombre de Mammifères, est moins sévère pour quelques espèces; la chèvre, le mouton et les Bovidés donnent une assez forte proportion de guérisons, et les animaux guéris possèdent l'immunité pour le Nagana.

Nous avons vu guérir ainsi, à l'Institut Pasteur, une chèvre et un mouton. La chèvre a guéri au bout de 5 mois, le mouton au bout de 6 mois 1/2.

Après nous être assurés que ces animaux étaient bien guéris et qu'ils possédaient l'immunité pour le Nagana, nous avons recherché si leur sérum avait des propriétés curatives. Ces sérums ne se sont montrés actifs qu'*en mélange* avec le sang contenant des Trypanosomes du Nagana [1]; injectés chez des animaux naganés, ils n'ont jamais enrayé l'évolution de la maladie; leur action a même été nulle lorsqu'on les injectait *en même temps* que le sang virulent, mais sur un autre point du corps.

Nous avons cherché à renforcer l'immunité de la chèvre et du mouton en injectant à ces animaux des doses massives de sang à Trypanosomes; les résultats ont été nuls. L'observation d'une chèvre guérie du Nagana, à laquelle nous avons injecté à 16 reprises du sang à Trypanosomes, nous paraît mériter d'être résumée ici [2].

1. Encore faut-il faire remarquer que cette faible activité disparaît généralement au bout de quelques jours dans les sérums conservés à la glacière, contrairement à ce qui a lieu pour le sérum humain.

2. Pour les détails de la maladie de la chèvre, voir *Bulletin Acad. de médecine*, 3 juin 1902, p. 671.

Chèvre pesant 24kg,500, inoculée le 25 octobre 1901 avec du sang de souris naganée. Elle contracte une infection très bénigne, qui ne se manifeste que par de l'hyperthermie (poussées fébriles au delà de 41°), de l'amaigrissement (le poids tombe à 20 kilogrammes) et la présence de Trypanosomes dans le sang. Ces parasites sont toujours extrêmement rares; on ne peut les déceler à l'examen microscopique, en très petit nombre, que les 28 et 29 octobre. Ultérieurement, il est nécessaire, pour démontrer leur présence, d'inoculer du sang de la chèvre à un rat ou à une souris; en novembre et décembre, 2 ou 3 gouttes de sang suffisent; le 31 janvier et le 6 février 1902, 1 c. c. de sang n'est plus virulent; les animaux inoculés les 24 février et 10 mars respectivement avec 3/4 et 2 c. c. de sang contractent une infection à Trypan. A partir du 1er avril, aucune des injections de sang de la chèvre n'a amené d'infection à Trypan., malgré les doses employées (jusqu'à 3 c. c.) et bien que la chèvre reçoive de nombreuses et abondantes réinoculations de sang riche en Trypan. Sa guérison et son immunité pour le Nagana sont donc bien établies. Voici la liste des réinoculations subies par la chèvre, toutes sous la peau : 1 (23 avril), 1 c. c. sang dilué souris naganée; — la 2e et les suivantes, sang de chien nagané; 2 (8 mai), 10 c. c., — 3 (21 mai), 15 c. c., — 4 (23 mai), 10 c. c., — 5 (26 mai), 10 c. c., — 6 (30 mai), 15 c. c., — 7 (6 juin), 50 c. c., — 8 (13 juin), 60 c. c., — 9 (24 juin), 20 c. c., — 10 (30 juin), 50 c. c., — 11 (8 juillet), 50 c. c., — 12 (5 août), 50 c. c., — 13 (6 septembre), 40 c. c., — 14 (16 septembre), 40 c. c., — 15 (26 septembre), 35 c. c., — 16 (4 octobre), 50 c. c.

On remarquera qu'en juillet et août, les inoculations ont été très espacées; la chèvre a eu, en effet, durant cette période, des abcès très volumineux, qui ont été assez longs à se cicatriser.

Bile des animaux morts du Nagana. — Dans un rapport présenté dernièrement au conseil du gouvernement de l'île Maurice et dont nous avons connaissance par le *Cernéen*, journal de l'île Maurice, Edington conseille l'emploi, à titre préventif et à titre curatif, de la bile d'animaux morts du Surra additionnée du tiers de son poids de glycérine. Cette bile, injectée dans la veine de mules et de chiens malades (à la dose de 20 c. c. pour les mules, de 10 pour les chiens), ferait disparaître en quelques heures les Trypanosomes du sang. D'autre part, Edington est convaincu que l'injection sous-cutanée assure l'immunité pendant un certain temps.

Nous avons expérimenté avec la bile d'un chien qui venait de succomber au Nagana. Cette bile glycérinée, injectée à la dose de 7 c. c. dans la veine d'un petit chien nagané pesant 6 kilogrammes, n'a pas fait disparaître les Trypanosomes. Employée à titre préventif ou curatif chez des souris de 15 grammes, elle

n'a modifié en rien la marche et la durée de l'infection : certaines de ces souris recevaient des doses variant de 0 c. c. 10 à 0 c. c. 50, 24 heures avant l'inoculation du virus; d'autres recevaient 0 c. c. 10 ou 0 c. c.15 de bile glycérinée, en même temps que le virus était inoculé en un autre point du corps; enfin, une souris a reçu 0 c. c. 15 alors que les Tryp. étaient peu nombreux dans son sang.

II

PRÉVENTION

Pour protéger des animaux contre une maladie microbienne, on peut employer des sérums immunisants, ou bien inoculer aux animaux des microbes affaiblis, des virus atténués, de manière à produire des atteintes de la maladie qui, quoique légères, confèrent l'immunité ; nous avons essayé de ces deux méthodes pour immuniser des animaux contre le Nagana.

1° *Recherche d'un sérum immunisant.* — Le sérum humain a, pour le Nagana, un pouvoir préventif très faible.

Si à une souris on inocule 1/10 de c. c. de sang à Trypanosomes mélangé à 4/10 de c. c. de sérum humain, ou à une dose plus forte, l'animal ne s'infecte pas; il en est parfois de même lorsque le sang et le sérum sont injectés simultanément sur deux points différents du corps; mais, ici, le résultat n'est pas constant: il arrive que l'infection se produit avec un retard.

Si on inocule à un rat 1 c. c. de sérum humain et, 24 heures après, du sang à Trypanosomes, l'animal s'infecte, mais la période d'incubation est prolongée; c'est seulement au bout de 5 à 9 jours que les Trypanosomes apparaissent dans le sang du rat. Lorsqu'on pratique des inoculations de Nagana avec du sang pris chez un animal qui a reçu récemment une injection de sérum humain, on constate de même que la période d'incubation se trouve allongée; une fois que les Trypanosomes se sont montrés dans le sang, la maladie évolue comme à l'ordinaire.

Le Nagana s'est développé chez des souris inoculées avec des Trypanosomes qui avaient été imprégnés de sérum humain, puis lavés; il y a eu seulement un retard plus ou moins marqué dans l'apparition des Trypanosomes.

Les souris inoculées avec un mélange de sang à Trypano-

somes et de sérum humain chez lesquelles l'infection ne se produit pas, n'acquièrent aucune immunité pour le Nagana.

Les sérums de chien, de mouton, de chèvre, de cheval, de poule, d'oie, mélangés au sang à Trypanosomes, n'empêchent pas l'infection de se produire chez les animaux auxquels on injecte le mélange, et la durée de l'incubation n'est pas allongée ; les propriétés du sérum humain sont donc bien spéciales à ce sérum.

On pouvait espérer que le sérum des animaux guéris du Nagana et ayant acquis l'immunité pour cette maladie aurait des propriétés immunisantes supérieures à celles du sérum humain ; ici encore, nos espérances ont été déçues, comme le montrent les observations qui suivent.

Le sérum d'un bouc infecté de Nagana depuis 47 jours et encore en cours d'infection a montré une faible activité préventive : deux souris inoculées avec 1/10 de c. c. de sang à Trypanosomes et 1 ou 2 c. c. du sérum (en mélange) ont survécu. Le sérum de ce bouc ne s'est montré actif qu'*en mélange*.

Le sérum de la chèvre guérie du Nagana, ayant l'immunité pour cette maladie, et à laquelle des injections successives de sang riche en Trypanosomes ont été faites (voir l'observation ci-dessus), n'a montré qu'une très faible activité préventive. La chèvre a été réinoculée tous les 8 jours environ avec 30 à 40 c. c. de sang de chien.

Ce sérum de chèvre immunisée, mélangé *in vitro* à du sang à Trypanosomes, n'exerce pas d'action microbicide nette. Dans le mélange, laissé 1 ou 2 heures à la température du laboratoire, puis porté à la glacière, on voit, 24 heures plus tard, la plupart des Trypanosomes encore vivants, quoique de mobilité diminuée. Ce sérum se comporte donc comme un sérum neuf. Il n'est pas plus agglutinant qu'un sérum de chèvre neuve.

Expérience faite avec le sérum de la chèvre 6 jours après la deuxième réinoculation. Deux souris reçoivent chacune 8/10 de c. c. du sérum mélangés à du sang à Trypan. ; les deux souris meurent en 3 j. 1/2.

Expérience faite 7 jours après la 6e réinoculation. Deux souris reçoivent chacune 1 c. c. du sérum de la chèvre en mélange avec du sang à Trypan. ; les deux souris survivent, mais elles n'ont pas acquis l'immunité. Deux souris reçoivent en deux points différents du corps : 1 c. c. du sérum de la chèvre et du sang à Trypan. ; ces deux souris meurent en 6 jours. Deux souris témoins meurent en 4 jours et 4 j. 1/2.

Le sérum de chèvre utilisé dans cette expérience, conservé 6 jours à la

glacière, a donné des résultats encore moins satisfaisants : même en mélange avec le sang à Trypan., il n'a pas empêché l'infection de se produire.

Expérience faite 7 jours après la 8e réinoculation. Une souris inoculée avec 1 c. c. de sérum et du sang à Trypan. en mélange ne s'infecte pas. Une souris inoculée avec 1/2 c. c. de sérum et du sang à Trypan. en mélange meurt en 5 jours. Une souris inoculée avec 1 c. c. de sérum et du sang à Trypan. au même point, ne s'infecte pas. Une souris inoculée avec 1 c. c. de sérum et du sang à Trypan., en deux points différents, meurt en 4 jours. Une souris inoculée avec 2 c. c de sérum et du sang à Trypan. en deux points différents, meurt en 3 j. 1/2, aussi vite qu'une souris témoin. Deux souris qui ont reçu, l'une 1 c. c. de sérum et l'autre 2 c. c. sont inoculées 29 heures après avec du sang à Trypan.; elles meurent aussi vite qu'une souris témoin.

Le même sérum, conservé 14 jours à la glacière et essayé de nouveau, n'a plus aucune action en mélange.

Expérience faite 7 jours après la 11e réinoculation. Une souris inoculée avec 1 c. c de sérum et 1/20 de c. c. de sang à Trypan. en mélange ne s'infecte pas. Une souris inoculée avec 1/2 c. c. de sérum et 1/20 de c. c. de sang à Trypan. en mélange meurt en 8 jours. Une souris inoculée avec 1 c. c. de sérum et du sang à Trypan. en deux points différents meurt en 5 jours. Les souris témoins meurent en 5 jours et 5 j. 1/2.

Expériences faites avec le sérum de la chèvre saignée 6, respectivement 7 jours après la 15e et la 16e réinoculations. Ce sérum n'a aucun pouvoir curatif. Injecté 40 heures avant les Trypan. ou en même temps qu'eux, mais en un point différent du corps, le sérum, à la dose de 1 et même 2 c. c., n'a aucune action. Employé *en mélange* avec le sang à Trypan., *il n'empêche pas l'infection, mais la retarde de plusieurs jours*. Ainsi, une souris inoculée avec un mélange de 1 c. c. de sérum et de 0 c. c. 05 de virus (avec Trypan. nombreux), est prise en 7 j. 1/2 et meurt en 9 j. 1/2 [le témoin, pris en 2 j. 1/2, meurt en 4 j. 1/2]; une souris inoculée avec un mélange de 1 c. c. de sérum et de 0 c. c. 2 du même virus, est prise en 6 jours et meurt en 8 j. 1/2; le témoin, pris en 1 j. 1/2, meurt en 3 j. 1/2].

Le pouvoir microbicide du sérum de la chèvre a donc baissé, malgré les nombreuses inoculations qu'elle a reçues. Mais il ne faut pas oublier que ces inoculations, surtout les dernières, ont produit de graves abcès et que l'immunisation a dû être suspendue à deux reprises.

Les expériences suivantes ont été faites avec le sérum d'un mouton guéri du Nagana[1], ayant l'immunité pour cette maladie et auquel on pratiquait, tous les huit jours environ, comme chez la chèvre, des injections sous-cutanées de sang de chien nagané, riche en Trypanosomes.

Expérience faite 7 jours après la 3e réinoculation. Une souris est inoculée avec 1 c. c. de sérum du mouton et 1/20 de c. c. de sang à Trypan. en

1. Pour l'observation de la maladie de ce mouton, voir *Bull. Acad. de médecine*, 3 juin 1902, p. 669.

mélange; la souris ne s'infecte pas. Une souris inoculée avec 1 c. c. de sérum et 1/20 de c. c. de sang à Trypan. en deux points différents meurt en 2 j. 1/2 comme une souris témoin.

Expérience faite 7 jours après la 6e réinoculation. Une souris inoculée avec 1 c. c. du sérum du mouton et 1/20 de c. c. de sang à Trypan. en mélange est prise en 5 jours et meurt en 10 jours; l'évolution de la maladie est irrégulière au point de vue de la durée de la maladie et de l'augmentation du nombre des Trypan., qui ne suit pas, comme d'ordinaire, une progression régulière. Une souris inoculée avec 1 c. c. de sérum et 1/20 de c. c. de sang à Trypan. en mélange est prise en 3 jours et meurt le 10e jour; l'évolution de la maladie est irrégulière. Une souris inoculée avec 1 c. c. de sérum et 1/20 de c. c. du sang à Trypan. en deux points différents du corps meurt au bout de 4 j. 1/2. Deux souris témoins meurent au bout de 5 jours et 5 j. 1/2.

Expérience faite avec le sérum d'un autre mouton guéri du Nagana et ayant reçu depuis 3 inoculations de sang de chien nagané.

2 souris témoins, inoculées chacune avec 1/10 de c. c. de sang de chien à Trypan., meurent en 4 jours 1/2 et 6 jours. — 1 souris qui reçoit, *en 2 points différents du corps*, 2 c. c. de sérum et la même dose de virus que les témoins, ne contracte pas d'infection. — Il en est de même des 4 souris qui reçoivent en mélange le sérum et le virus : 1 c. c. de sérum et 1/10 c. c. de virus pour 2 d'entre elles; 1/2 c. c. de sérum et 1/10 c. c. de virus pour la 3e; 1 c. c. de sérum et 1/2 c. c. de virus pour la 4e.

M. le professeur Nocard a bien voulu nous communiquer la note très intéressante qui suit :

Une jeune vache est inoculée le 7 juin 1902, avec 2 c. c. de sang de rat nagané. Le 10 juin, la température de la vache monte à 40°8 et l'examen histologique du sang révèle l'existence de Trypan. non rares (1 à 2 par champ). A partir du 11 juin la température reste normale et l'examen histologique du sang est négatif.

Depuis le 11 juin cette vache a été inoculée 8 fois (inoculations intrapéritonéales). Elle a reçu au total 852 c. c. de sang de chat ou de chien, très riche en Trypanosomes. Son sang, inoculé à des souris à cinq reprises, les 20 juin, 14 juillet, 16 août, 3 septembre et 10 octobre, ne s'est montré infectieux que les deux premières fois.

Les souris inoculées sans succès les 16 août, 3 septembre et 10 octobre n'étaient pas vaccinées; elles ont succombé à une deuxième inoculation de sang virulent.

Le sérum de cette vache mélangé, à parties égales, avec du sang d'un animal nagané, retarde notablement l'apparition des Trypanosomes chez les animaux inoculés avec le mélange, mais il n'empêche ni l'infection, ni la

mort. Injecté sur un autre point que le sang virulent, il semble n'exercer aucune influence sur la marche de l'infection.

Le sérum de cette vache est très agglutinant pour les Trypanosomes.

Le sérum de cette vache, ayant acquis l'immunité pour le Nagana, n'avait donc qu'une très faible activité préventive, bien qu'on se fut efforcé de renforcer l'immunité au moyen d'injections intra-péritonéales de sang riche en Trypanosomes.

Les sérums de poule et d'oie ayant reçu des injections de sang riche en Trypanosomes, ont montré une activité préventive nulle ou très faible. Nous devons signaler, cependant, le fait suivant : une souris inoculée avec 1/2 c. c. de sérum de poule traitée, en mélange avec du sang à Trypanosomes, a survécu 15 jours, alors qu'une souris témoin mourait au bout de 7 jours; les Trypanosomes inoculés dans cette expérience étaient peu mobiles au moment de l'inoculation.

Les sérums des rats naganés ayant reçu de 3 à 7 injections arsenicales n'ont montré qu'une action préventive très faible. Nous avons constaté, comme Bruce, que l'arsenic n'avait pour le Nagana aucune vertu préventive. Les animaux traités préventivement par l'arsenic s'infectent aussi facilement et aussi rapidement que les autres, et l'évolution de la maladie n'est pas modifiée.

2° *Essais d'atténuation du virus.* — Nous avons employé différents procédés pour atténuer la virulence des Trypanosomes du Nagana.

Le sang des animaux atteints de Nagana perd assez rapidement sa virulence, quand il est conservé à la glacière ou à la température du laboratoire; au bout de quelques heures, les mouvements des Trypanosomes sont considérablement ralentis; au bout de 24 heures, on ne trouve que de rares Trypanosomes mobiles, quelquefois tous les Trypanosomes sont immobiles. Lorsqu'on inocule du sang ainsi conservé, la période d'incubation est notablement plus longue qu'avec le sang frais, contenant des Trypanosomes très mobiles, mais l'affaiblissement des Trypanosomes n'a pas d'autre effet sur l'évolution de la maladie; dès que les Trypanosomes se sont montrés dans le sang des animaux inoculés, ils s'y développent avec la rapidité ordinaire, et la maladie ne perd rien de sa gravité.

Nous avons expérimenté avec du sang à Trypanosomes

chauffé à différentes températures et pendant un temps variable.

Lorsqu'on examine du sang riche en Trypanosomes du Nagana qui a été chauffé pendant 1 heure à la température de 41°, on constate que les parasites sont immobiles, déformés, globuleux; le sang ainsi chauffé produit l'infection avec un retard très marqué, mais la maladie ne perd rien de sa gravité ; un chauffage plus prolongé à 41° et un chauffage d'une durée plus courte, aux environs de 44°, tuent les Trypanosomes. On voit donc que par le chauffage on ne réussit pas à atténuer la virulence du Nagana ou que, du moins, l'atténuation ne se traduit que par l'allongement de la période d'incubation de la maladie.

En mélangeant au sang d'un animal nagané une solution de bleu de toluidine à 1 p. 100, on atténue la virulence des Trypanosomes du Nagana. Chez les animaux inoculés avec ce mélange, la période d'incubation est plus longue que chez les animaux inoculés avec le sang pur.

Chez deux rats inoculés avec un mélange de sang à Trypanosomes 8 parties, et bleu de toluidine 1 partie, préparé depuis 20 minutes, les Trypanosomes ne se sont montrés dans le sang que du 7e au 8e jour.

Chez un cobaye inoculé avec un mélange de sang à Trypanosomes et de solution de bleu de toluidine à 1 p. 100, fait depuis deux minutes, les Trypanosomes ne se sont montrés dans le sang qu'au bout de 12 jours.

En général, l'affaiblissement de la virulence des Trypanosomes ne se révèle que par cet allongement de la période d'incubation ; la maladie une fois déclarée, suit son cours normal. Il y a cependant des exceptions.

Chez une souris infectée avec du sang à Trypanosomes mélangé de bleu de toluidine, les Trypanosomes ont apparu le 8e jour seulement après l'inoculation, et l'infection a eu une marche traînante tout à fait exceptionnelle.

Chez un rat inoculé dans les mêmes conditions, les Trypanosomes se sont montrés dans le sang le 5e jour après l'inoculation, et ils ont *disparu définitivement* au bout de 3 à 4 jours : fait unique dans l'histoire du Nagana des rats. Ce Nagana atténué n'avait pas donné l'immunité au rat.

Ce dernier fait est à rapprocher des exemples de réinfection que nous avons cités (p. 800) chez des souris guéries du Nagana au moyen du sérum humain. Il semble prouvé qu'une atteinte de Nagana provoquée par un virus atténué ou jugulée par le traitement ne suffit pas à donner l'immunité : nous n'avons observé l'immunité contre le Nagana que chez des animaux (chèvre, mouton, vache) qui, après une infection de longue durée, avaient guéri spontanément. On peut en conclure qu'on arrivera difficilement à immuniser des animaux contre le Nagana en leur inoculant des Trypanosomes à virulence atténuée et en provoquant chez eux des formes légères du mal [1].

Des inoculations préalables de sang à Trypanosomes conservé quelques jours à la glacière, ou quelques heures au-dessus de 40°, ou mis un certain temps en contact avec une matière colorante et ayant perdu toute virulence, n'empêchent pas l'infection que produit un virus frais ou atténué dans les conditions que nous venons d'exposer et ne changent rien à la marche de cette infection.

On a vu (p. 787) que R. Koch et Schilling ont essayé d'atténuer la virulence des Trypanosomes du Nagana en faisant passer ces parasites par des espèces animales différentes et qu'ils disent avoir obtenu, par ce procédé, quelques résultats favorables. On a vu aussi que les faits cités par ces auteurs n'étaient pas concluants.

D'après nos observations, la virulence de *Tr. Brucei* peut être un peu atténuée par le passage chez des espèces différentes, mais le Trypanosome se désadapte peu en passant d'une espèce à l'autre et, en tout cas, il récupère rapidement sa virulence, comme le prouve l'expérience suivante :

Le 24 avril 1902, un chien est inoculé avec le sang d'un mouton infecté de Nagana depuis 6 mois. Le 1er mai, les Trypan. apparaissent chez le chien.

Le 2 mai, on inocule, avec quelques gouttes du sang du chien, fortement dilué dans l'eau physiologique citratée, un rat et deux souris ; l'inoculation est faite sous la peau.

1. Une femelle de rat, inoculée le 23 septembre 1902 et soumise au traitement mixte alternatif par le sérum humain et l'arsenic, à partir du 25, fait, le 14 octobre, 7 petits, tous vivants et bien conformés ; elle les élève. Le 10 novembre, les petits mangent seuls ; deux d'entre eux sont inoculés sous la peau avec du sang à Trypanosomes en même temps que deux petits du même poids provenant d'un rat non nagané ; les quatre petits rats présentent la même sensibilité au Nagana, sensibilité un peu plus grande que celle des rats adultes.

Le 4 mai, les Trypan. apparaissent dans le sang du rat; le 6 mai, ils sont très nombreux, et le rat est trouvé mort le 7 au matin.

Le 4 mai, les Trypan. apparaissent dans le sang des souris; le 6, ils sont très nombreux, et, le 7 au matin, les deux souris sont trouvées mortes.

Des Trypanosomes qui avaient passé par le mouton (6 mois) et ensuite par le chien ont donc donné lieu, chez le rat et la souris, à des infections aussi aiguës que celles qui sont produites par les Trypanosomes inoculés de rat à rat ou de souris à souris.

Il est possible, d'ailleurs, que l'atténuation du virus pour un espèce donnée se produise à la suite de très nombreux passages chez une autre espèce; c'est peut-être le cas du virus avec lequel nous avons fait nos expériences. Alors que le Nagana est très grave chez les Bovidés, en Afrique, notre virus, inoculé par M. Nocard à trois vaches, n'a produit chez ces animaux que des infections légères. La différence d'action peut tenir à une question de race des Bovidés; mais elle peut tenir aussi à une atténuation due aux innombrables passages par Mammifères divers (autres que des Ruminants), qu'a subis le virus depuis 1896, époque à laquelle il a été importé du Zoulouland en Europe. En tout cas, il serait très important d'essayer la virulence des Trypanosomes, que nous avons actuellement en mains, sur les Bovidés de l'Afrique australe; peut-être, si notre seconde hypothèse est vraie, ce virus est-il devenu un vaccin, utilisable en Afrique, pour préserver les Bovidés de l'infection naturelle.

***

En résumé, en ce qui concerne le traitement du Nagana, l'acide arsénieux et le sérum humain sont les seuls médicaments auxquels nous ayons reconnu une activité incontestable.

L'acide arsénieux peut rendre des services quand il s'agit de prolonger la vie d'animaux de trait; en dehors de ces conditions spéciales, son emploi ne peut pas être conseillé; les animaux ainsi traités ne guérissent presque jamais, ils sont une cause d'infection pour les animaux sains; enfin, il serait dangereux de donner, à des animaux destinés à la boucherie, les fortes doses d'acide arsénieux qui sont nécessaires pour combattre le Nagana.

Le sérum humain, qui nous a donné quelques guérisons

complètes chez les souris, ne fait, le plus souvent, comme l'arsenic, que retarder la mort; d'ailleurs, le traitement des gros animaux par le sérum humain est impraticable, à cause des doses de sérum qu'il faudrait employer.

Nous n'avons pas mieux réussi à prévenir le Nagana qu'à le guérir; mais nous ne donnons pas comme définitifs les résultats auxquels nous sommes arrivés; nous comptons poursuivre nos recherches, et ces recherches, si importantes, seront évidemment poursuivies également par d'autres observateurs. Peut-être des expériences faites sur des espèces animales autres que celles qui étaient à notre disposition pourraient-elles aboutir. Il serait intéressant, par exemple, d'expérimenter sur les antilopes ou sur les buffles d'Afrique qui, souvent infectés de Nagana, présentent à la maladie une grande résistance. De pareilles expériences ne pourraient être faites qu'en Afrique.

Dans l'état actuel de nos connaissances, on peut dire qu'il n'existe aucune médication efficace et pratique contre le Nagana et qu'on ne connaît pas de procédé sûr d'immunisation des animaux contre cette maladie. Ces conclusions s'appliquent aussi au Surra, si voisin du Nagana. Les mesures de prophylaxie destinées à restreindre les zones d'endémicité de ces maladies et à empêcher leur importation dans les pays encore indemnes ont, par suite, une très grande importance.

On devra étudier, dans tous les pays, la répartition des maladies à Trypanosomes, signaler avec précision les zones dangereuses et rechercher comment ces maladies se propagent. Nous ne sommes exactement renseignés à ce sujet que pour le Nagana; on sait que c'est la Mouche tsétsé (*Glossina morsitans*) qui propage cette maladie dans l'Afrique centrale. La tsétsé n'est dangereuse qu'autant qu'elle a piqué récemment des animaux atteints de Nagana; il est prouvé qu'elle s'infecte surtout en piquant le gros gibier : antilopes et buffles. Les recherches de Bruce ont démontré que ces animaux étaient souvent naganés, mais sous des formes latentes.

Foà[1] et Theiler[2] constatent que la destruction du gros gibier a toujours pour effet d'assainir les régions à tsétsé et à Nagana. La civilisation d'un pays a pour résultat constant la

1. Foa, *Du cap au lac Nyassa*, Paris, 1897.
2. Theiler, *Schweizer-Archiv f. Thierheilkunde*, XLIII, 1901.

destruction ou le refoulement du gros gibier; on peut donc espérer que les zones à Nagana iront en se restreignant, à mesure que les Européens avanceront davantage dans ce continent africain, dont les côtes seules étaient connues naguère, mais que sillonnent déjà, sur beaucoup de points, des chemins de fer de pénétration.

Quand on connaît bien les zones à tsétsé et à Nagana, on peut souvent prendre des mesures préventives efficaces, s'il s'agit seulement de traverser ces régions ; une de ces mesures, la meilleure peut-être, consiste à ne voyager que la nuit; la tsétsé ne pique en effet que le jour. On a conseillé d'enduire les animaux que l'on veut protéger avec différentes substances, la créoline notamment[1]. Dans le hinterland du Togo où règne le Nagana, les indigènes enduisent les animaux avec le suc d'une plante : *Amomum Melegueta*, pour les protéger contre les piqûres de la tsétsé[2]. La fumée éloigne les tsétsé et peut être utilisée, dans les campements par exemple.

Les pays qui ont été épargnés jusqu'ici par les maladies à Trypanosomes doivent prendre des mesures contre l'importation de ces maladies, d'autant plus à redouter aujourd'hui, que le commerce d'exportation du bétail vivant a pris une grande extension.

De graves épizooties de Surra ont été observées récemment à Java[3], aux Philippines[4] et à l'île Maurice[5].

L'épizootie qui a été pour l'île Maurice une véritable calamité présente un grand intérêt et les enseignements qu'on peut tirer de son histoire doivent être attentivement médités.

Maurice s'approvisionne ordinairement de bétail à Madagascar ; pendant la guerre du Transvaal, beaucoup d'animaux ayant été achetés pour l'Afrique du Sud, on a dû faire venir des bestiaux de l'Inde, et ce sont des Bovidés infectés de Surra, venant de l'Inde, qui ont causé l'épizootie. La nature de la maladie ayant été méconnue, les animaux malades ont été vendus et répartis sur différents points de l'île ; on s'explique ainsi que l'épizootie se soit propagée avec rapidité.

1. Stordy, *The Veterinarian*, janv. 1899, LXXII, p. 11-20.
2. Schilling, *Centralbl. f. Bakter.*, Erste Abteil. Original, 1902, XXXI, p. 452.
3. Schat, *Arch. de l'industrie sucrière à Java*, 1902.
4. *New-York med. Journal*, 8 février 1902, et Salmon et Stiles, *l. c.*
5. Laveran et Nocard, *Acad. de méd.*, 1er juillet 1902. — Laveran, *Acad. de méd.*, 28 octobre 1902.

Au commencement du mois de juin dernier, la mortalité occasionnée par le Surra chez les Équidés et les Bovidés était effrayante; les propriétaires de Maurice se demandaient avec inquiétude s'il serait possible de rentrer la récolte des cannes à sucre.

Quelques-unes de nos colonies : la Réunion, Madagascar, la Cochinchine, le Tonkin, sont évidemment très exposées à devenir le théâtre d'épizooties aussi meurtrières que celle qui vient de causer à Maurice de si grandes pertes. Quelques cas d'une maladie à Trypanosomes ont été constatés déjà à la Réunion par le Dr Vassal[1], et M. Carrougeau, vétérinaire de l'Institut Pasteur de Nha-Trang, a observé sur les Équidés de l'Annam des cas non douteux de Surra. M. Carrougeau a bien voulu nous envoyer des préparations du sang des animaux malades; les Trypanosomes existant dans ces préparations sont identiques à ceux qui ont produit l'épizootie de Maurice.

L'importation des animaux provenant des régions contaminées doit être interdite ou du moins sévèrement réglementée.

Les animaux vivants importés de régions suspectes doivent être examinés avec soin par des vétérinaires, à l'arrivée dans les ports, et abattus si l'existence d'une Maladie à Trypanosomes est constatée.

« Alors même que des animaux infectés de Surra ou de Nagana ont été introduits dans un pays indemne, on peut prendre encore des mesures efficaces pour empêcher la propagation de la maladie, à condition que le diagnostic soit porté rapidement. Les animaux infectés seront abattus dès que la maladie aura été reconnue, les animaux suspects seront isolés.

« Lors de l'épidémie de Java, une visite générale des étables a été prescrite, les animaux malades ont été abattus ou isolés des animaux sains; on s'est efforcé de protéger les animaux contre les piqûres des mouches, et on a réussi ainsi à limiter l'épizootie; ces mesures sont, on le conçoit, d'une application d'autant plus difficile que la maladie a pris plus d'extension au moment où sa véritable nature est reconnue; il importe donc que l'attention des vétérinaires soit attirée sur ces Maladies à Trypanosomes dont le diagnostic est d'ailleurs facile, à condition de faire l'examen du sang[2]. »

1. Laveran et Nocard, *loc. cit.*
2. Laveran et Nocard, *loc. cit.*

Le 1er juillet dernier, l'Académie de Médecine a émis le vœu « que l'importation en France ou dans les Colonies françaises d'animaux provenant de pays où règnent le Surra, le Nagana ou d'autres Maladies à Trypanosomes, soit interdite ou sévèrement réglementée ».

RECHERCHES
SUR L'ABSORPTION DE LA TOXINE TÉTANIQUE

Par MM. A. MARIE et V. MORAX

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

L'affinité de la tétanine[1] pour la substance nerveuse constitue une des propriétés les plus remarquables et les plus intéressantes de cette toxine. En quelque point qu'on l'inocule chez les mammifères, on assiste toujours, après une période d'incubation, à l'éclosion de réactions nerveuses presque exclusivement motrices, qui semblent traduire la souffrance du neurone moteur et font supposer une action élective sur lui.

Le but des expériences que nous résumerons dans ce travail a été de rechercher le mécanisme de la propagation de la toxine, depuis son point de pénétration jusqu'à la cellule sensible.

I

ABSORPTION DE LA TOXINE TÉTANIQUE PAR LES NERFS PÉRIPHÉRIQUES

Il ne suffit pas de constater des troubles de la motilité pour affirmer que la tétanine a lésé directement le neurone moteur. On peut supposer avec M. Goldscheider que l'état d'activité de ce neurone se manifeste par le seul fait de l'application périphérique de la toxine; avec MM. Vaillard et Vincent que la tétanine agit à la fois sur la moelle épinière et sur le muscle. Mai on peut aussi admettre que le neurone moteur se trouve lésé par la pénétration de la toxine dans la substance d'un de ses éléments, cylindraxile ou cellulaire, et que, suivant l'un ou l'autre cas, la nature ou l'ordre d'apparition des symptômes réactionnels seront différents.

Lorsqu'on expérimente sur le lapin, animal relativement peu sensible à l'intoxication tétanique, on constate que l'injection d'une dose mortelle dans un muscle de la patte donne lieu, après 24-36 heures d'incubation, à une contracture localisée d'abord aux muscles de ce membre, et qui est suivie d'un

1. Nous employons le mot « tétanine » comme synonyme de toxine tétanique

tétanos généralisé. Introduisons au contraire la toxine directement dans le sang, en ayant soin d'injecter une dose dix fois supérieure à la dose inoculée dans le muscle : nous verrons éclater après 48 heures environ des contractures généralisées d'emblée : c'est le tétanos splanchnique.

Pour expliquer ces différences entre les deux formes de tétanos, l'un de nous[1] avait émis l'hypothèse d'une pénétration de la toxine par les nerfs périphériques dans les cas de tétanos local.

L'hypothèse de l'absorption par les nerfs périphériques était basée sur les expériences suivantes :

1° L'inoculation, dans le nerf sciatique d'un lapin, d'une dose de toxine insuffisante pour tuer l'animal par la voie sanguine, provoque l'apparition d'accidents tétaniques;

2° L'inoculation à un lapin d'une dose mortelle dans la patte antérieure, qu'une section du deuxième nerf cervical a totalement paralysée, n'est suivie d'aucun phénomène tétanique.

L'expérience de M. Wassermann[2], conçue dans le but d'appuyer l'hypothèse des chaînes latérales dans la théorie de M. Ehrlich, vint donner la démonstration *in vitro* la plus frappante de l'affinité de la toxine tétanique pour la substance nerveuse. On sait, en effet, qu'il suffit d'introduire une faible quantité d'émulsion cérébrale dans une solution de tétanine pour fixer la totalité du poison et pour rendre le liquide surnageant inoffensif.

Le même résultat peut être obtenu avec une émulsion de moelle épinière, à la condition d'augmenter la dose de substance nerveuse.

En ce qui concerne les nerfs périphériques, qui sont en partie constitués par le cylindraxe, expansion du protoplasma du neurone, M. Knorr[3] dit ne connaître aucun résultat positif direct. Il ajoute cependant que les expériences permettent de supposer dans les nerfs la présence d'une substance analogue à celle que M. Wassermann a mise en évidence dans le cerveau

1. A. Marie, Recherches sur la toxine tétanique. *Ces Annales.* 1897, juillet, p. 597.
2. Wassermann. *Berl. Klin. Woch.* 1898, n° 1.
3. Knorr, Das Tetanusgift und seine Berichtungen zum thierischen Organismus, *Munchener Med. Woch.* 1898, n° 12.

et dans la moelle. Nous avons cherché à élucider ce point par les expériences suivantes.

Expérience I.

On broie dans un mortier 5 grammes de nerf sciatique d'un chien, au contact d'une solution de 5 doses mortelles pour le cobaye de toxine tétanique. La même opération est faite avec la substance cérébrale du chien. Après 24 heures de séjour à la glacière, on ajoute à chaque émulsion 2 c. c. d'eau physiologique, puis on centrifuge. On injecte séparément le dépôt et le liquide à un cobaye et à une souris. Le tableau ci-dessous résume une de ces expériences.

27 JUIN 1902	INJECTION du	28	29	30	1	2	3	OBSERVATIONS	
Cobaye.	Dépôt.	0	—	=	=	=	=	Inj. dans la patte.	Cerveau.
—	Liquide.	0	0	0	0	+		Inj. dans le périt. Pas de tétanos.	
Souris.	—	0	0	0	0	0	0	Inj. dans la patte.	
Cobaye.	Dépôt.	—	=	≡	+			Inj. dans la patte.	Sciatique.
—	Liquide.	0	=	+				Inj. dans le périt.	
Souris.	—	=	+					Inj. dans la patte.	

Dans une autre expérience, nous avons étudié comparativement le pouvoir fixateur du foie, de la rate, du cerveau et du sciatique. Il en est ressorti que *les sciatiques ne présentent pas un pouvoir fixateur supérieur à celui du foie ou de la rate*, alors que le pouvoir neutralisant du cerveau apparaissait aussi nettement que dans l'expérience ci-dessus.

On serait tenté de conclure de ces expériences que la toxine tétanique n'a aucune affinité pour la substance des nerfs. Il n'en est rien, car, ainsi que M. Meyer [1] l'a signalé, la toxine tétanique se retrouve dans la substance des nerfs périphériques lorsqu'une injection de plusieurs doses mortelles a été faite dans les muscles qu'ils innervent.

L'expérience de M. H. Meyer consiste en ceci : on injecte

1. Hans Meyer, Tetanus Studien. Festschrift zur Feier des sechz. Geburtst. von Max Jaffe, *Braunschweig*, 1901, p. 295.

dans la patte d'un cobaye 10 doses mortelles de toxine tétanique ; après 24 heures, lorsque l'animal est en plein tétanos, ou encore après sa mort, on resèque le sciatique correspondant entre le creux poplité et l'échancrure sciatique, et on l'insère sous la peau de la patte postérieure d'une souris : celle-ci prend le tétanos. Si l'on injecte de même à d'autres souris moelle, cerveau ou tout autre organe, à l'exception du sang, nous savons que le résultat est négatif [1]. Cette expérience de M. Meyer fournit donc une démonstration directe de la présence de la tétanine dans le nerf périphérique. Il s'agit bien, en effet, d'une fixation élective de la tétanine sur la substance du nerf : les tissus qui entourent celui-ci, le muscle, par exemple, à la condition que ce ne soit pas celui dans lequel la toxine a été injectée, ne donnent jamais de tétanos aux souris qui les reçoivent sous la peau.

Voici une de ces expériences : on injecte dans les muscles de la patte d'un cobaye 10 doses mortelles de toxine tétanique ; 24 heures après, on sacrifie l'animal et on prélève des fragments de tissus.

Expérience II.

11 AOUT 1902	INOCULATION SOUS-CUTANÉE DE	12	13	14	15
Souris.	0,5 c. c. Sang du cœur.	≡	+		
—	Sciatique gauche.	0	≡	+	
—	Languette musculaire avoisinant le sciatique.	0	0	0	0
—	Muscle extenseur de la cuisse.	0	0	0	0
—	Nerf brachial.	0	0	0	0
—	Tissu adipeux du creux poplité.	0	0	0	0

On peut démontrer indirectement qu'il se produit une fixation de la toxine sur la substance cylindraxile du nerf périphérique. Il suffit pour cela de provoquer la dégénérescence du cylindraxe par la section du tronc nerveux au voisinage de son origine rachidienne. Réalisons cette section chez 3 lapins, puis attendons 2,6 et 15 jours avant d'injecter dans les deux

1. A. Marie, *loco cit.*

pattes 10 doses mortelles de tétanine. Reséquons ensuite les sciatiques après 24 heures ; l'inoculation du sciatique normal servira de témoin à l'inoculation du sciatique sectionné.

Expérience III.

TEMPS écoulé entre la section du nerf et l'injection de la tétanine.	SOURIS inoculée avec	1	2	3	4	5	6
2 jours....	Sciatique normal.	—	≡	+			
	— sectionné.	—	≡	+			
6 —	— normal.	—	≡	+			
	— sectionné.	0	0	0	—	—	—
15 —	— normal.	0	0	0	—	=	≡+
	— sectionné.	0	0	0	0	0	0

De cette expérience il résulte que le nerf séparé de son centre médullaire présente encore après 48 heures des propriétés fixatrices aussi fortes que celles qu'il possède dans les conditions normales. Après 6 jours, au contraire, il ne fixe plus de quantités appréciables de tétanine. Or, c'est entre le 1er et le 3e jour que le segment périphérique du nerf sectionné du cobaye perd son excitabilité, et que se produisent la dégénération et le morcellement du cylindraxe.

Nous sommes donc autorisés à conclure qu'il existe réellement une affinité spécifique de la tétanine pour le cylindraxe des troncs nerveux périphériques.

Demandons nous maintenant par quelle voie la toxine pénètre dans le nerf : par les terminaisons périphériques ou par les capillaires du tronc nerveux?

Les expériences suivantes sont favorables à la première hypothèse.

Expérience IV.

On pratique sur un cobaye la section du sciatique, au niveau de l'articulation du genou, puis on injecte dans les muscles du mollet 10 doses mortelles de tétanine.

Après 24 heures, l'animal présente un tétanos généralisé :

on enlève le bout central du sciatique que l'on insère sous la peau de la patte d'une souris : celle-ci ne présente par la suite aucun symptôme tétanique.

Sur un autre cobaye, nous avons sectionné le sciatique au niveau de sa racine et inoculé la même dose de tétanine dans le mollet. L'insertion du bout périphérique du nerf a provoqué chez la souris des accidents tétaniques graves.

Ces expériences nous fournissent déjà des indications précises sur le mode de pénétration de la toxine dans le nerf.

Le tronc nerveux séparé de son centre ganglionnaire conserve ses propriétés d'attraction pour la toxine, sous la condition expresse de garder ses connexions naturelles avec le muscle[1]. *Lorsque, au contraire, le tronc nerveux a été séparé de ses éléments terminaux, il ne renferme pas de toxine.*

Il nous a paru intéressant de déterminer le temps nécessaire à la toxine pour pénétrer en quantité appréciable dans le tronc nerveux. Dans ce but, nous avons repris l'expérience de M. Meyer en enlevant le tronc du sciatique à des temps variables, 5, 10, 30, 60 minutes, après l'injection de la toxine dans les muscles du mollet.

L'insertion du sciatique dans la patte des souris n'a jamais donné le tétanos quand le tronc nerveux était reséqué moins de 1 heure après l'injection. Par contre, toutes les fois que le nerf était prélevé plus de 60 minutes après l'inoculation de la toxine, les souris présentaient un tétanos plus ou moins sévère.

Voici cette expérience :

1. Néanmoins, l'expérience démontre que la pénétration du nerf par la toxine est beaucoup plus lente lorsque le centre médullaire est détruit. Alors que, dans les conditions normales, le sciatique se montre tétanigène pour les souris 1 heure 1/2 après l'injection dans les muscles du cobaye normal, il faut attendre 24 heures pour constater une dose équivalente de tétanine dans le sciatique d'un animal qui a subi la section de ce nerf à l'échancrure, ou la destruction de sa moelle lombaire.

EXPÉRIENCE V.

16 JUIL. 1902	INOCULATION DE	17	18	19	20	21	OBSERVATIONS
Souris.	Sciatique.	0	0	0	0	0	15 minutes après l'injection.
Souris.	0,5 sang du cœur.	—	=	≡	≡	≡	
Souris.	Sciatique.	0	0	0	0	0	30 minutes.
Souris.	0,5 sang du cœur.	—	=	≡	+		
Souris.	Sciatique.	—	≡	≡	+		60 minutes.
Souris.	0,5 sang du cœur.	=	≡	≡	+		

L'absorption de la toxine par le nerf est donc assez rapide : une heure après l'injection, celui-ci en contient des quantités mortelles pour la souris. La pénétration dans le sang est, il est vrai, antérieure, puisque 15 minutes après l'injection ce liquide en renferme déjà une notable proportion. Nous verrons plus loin l'importance et le rôle relatif de ces deux modes de diffusion de la toxine au point de vue de sa pénétration dans la cellule nerveuse.

II

ÉTAT DE LA TÉTANINE DANS LES NERFS PÉRIPHÉRIQUES

Les expériences *in vivo* nous ayant démontré l'affinité de la tétanine pour les nerfs périphériques, nous sommes amenés à expliquer ce fait en supposant une combinaison de cette toxine avec la substance du cylindraxe. Étudions donc les caractères de cette combinaison ou, si l'on veut, de cette fixation :

1° L'un des plus remarquables, c'est la grande facilité avec laquelle on réussit à séparer les deux éléments de la combinaison, contrairement à ce que l'on observe lorsqu'on a mélangé la tétanine avec la substance cérébro-médullaire. La toxine, fixée sur le nerf pendant la vie de l'animal, ne tarde pas à

s'en séparer complètement : l'expérience *in vivo*, consistant dans l'inoculation à la souris du sciatique du cobaye tétanique, nous a déjà révélé ce fait; l'expérience suivante *in vitro* va rendre cette propriété encore plus manifeste.

Expérience VI.

Enlevons le sciatique d'un cobaye qui a reçu dans les muscles du mollet 10 doses mortelles, et plongeons le nerf pendant 1 heure dans 1 c. c. d'eau physiologique stérilisée, puis inoculons à une souris le liquide et à une autre le nerf. Répétons la même expérience en prolongeant pendant 6 et 24 heures la durée de la macération dans l'eau physiologique.

DURÉE de la macération.	INOCULATION à la souris du	1	2	3	4	5
1 heure	Liquide........	—	—	=	=	=
	Nerf...........	0	—	—	=	=
6 heures............	Liquide........	—	≡	+		
	Nerf...........	0	0	0	0	0
24 —	Liquide........	—	=	=	=	≡
	Nerf...........	0	0	0	0	0

Une heure a donc suffi pour que la toxine passe en grande partie dans le liquide de macération ; après 6 heures la totalité de la toxine semble avoir abandonné la substance nerveuse.

2° On sait que la combinaison du cerveau avec la toxine n'est pas la même pour toutes les espèces animales, que le cerveau du lapin, par exemple, est beaucoup moins actif que celui du cobaye. En serait-il de même pour la combinaison de la toxine avec le nerf?

Pour résoudre cette question, il nous suffira de doser la quantité de toxine contenue dans le sciatique d'un lapin, inoculé dans les muscles du mollet, dans les mêmes conditions qu'un cobaye témoin, tout en tenant compte de la différence de sensibilité des deux animaux à la tétanine. Nous injectons donc au cobaye ainsi qu'au lapin 10 doses mortelles pour chacun d'eux (en poids 0,001 pour le cobaye et 0,1 pour le lapin).

Après 24 heures, on enlève les sciatiques : celui du cobaye pèse 0,023 milligr; il est inséré sous la peau d'une souris qui meurt du tétanos en 48 heures.

Le sciatique du lapin est divisé transversalement en deux tronçons dont l'un pèse 0,023, poids égal au nerf du cobaye, l'autre, le double, exactement 0,045 milligr.

La souris inoculée avec le plus petit fragment ne présente aucun symptôme; la seconde est atteinte au 3e jour, elle ne présente qu'un tétanos très léger.

On se trouve amené à conclure que *l'affinité de la toxine pour le nerf du lapin est très inférieure à celle qu'elle présente pour le nerf du cobaye.* Nous rapprocherons ce fait de la faible sensibilité du lapin vis-à-vis de la toxine tétanique.

3° Maintenant, si l'on compare l'affinité si grande de la tétanine pour la substance des corps cellulaires des neurones avec l'attraction élective, mais fugace, de cette toxine pour leurs expansions périphériques, on se trouve conduit à admettre l'existence de phénomènes de déplacement de la tétanine dans la substance cylindraxile; ces phénomènes donnent l'impression d'une véritable circulation de la toxine dont le courant serait toujours cellulipète, se produisant par conséquent de la substance douée de l'affinité la plus faible vers celle qui possède l'affinité la plus forte : c'est ce que les expériences suivantes vont démontrer.

Nous avons vu qu'une heure après l'inoculation de la tétanine dans les muscles de la patte du cobaye, le nerf sciatique se trouve déjà imprégné de toxine. Nous savons d'autre part qu'en sectionnant le sciatique au creux poplité, on empêche la pénétration de la tétanine dans le bout central du nerf. Pratiquons maintenant la section du sciatique au creux poplité, non pas avant, mais 2 ou 24 heures après l'inoculation de la toxine, c'est-à-dire à un moment où nous savons que le nerf est chargé de cette substance. Notre section aura pour but de supprimer l'arrivée de nouvelles quantités de toxine. S'il existe réellement un déplacement cellulipète de celle-ci, le bout central demeuré en connexion avec le centre médullaire devra se dépouiller peu à peu de la toxine qu'il contenait : c'est ce que l'expérience vérifie pleinement.

Expérience VII.

6 cobayes reçoivent chacun dans les muscles du mollet 10 doses de tétanine ; 1 h. 1/2 après l'injection, le sciatique est sectionné au creux poplité et le tronc nerveux laissé en place. Puis 15, 60, 90', 2 heures et 24 heures après la section, on enlève le tronc de sciatique et on l'inocule à des souris.

25 AOUT 1902	ABLATION du sciatique après	Inoculation à la	1	2	3	4	5	6
Cobaye 1.	Témoin.	Souris.	0	=	=	≡	+	
— 2.	15 minutes.	—	—	—	=	=	=	=
— 3.	60 —	—	—	—	=	=	=	=
— 4.	90 —	—	0	—	=	=	=	=
— 5.	2 heures.	—	0	0	0	0	0	—
— 6.	24 —	—	0	0	0	0	0	0

Il ressort très nettement de cette expérience que le nerf s'est dépouillé de la presque totalité de la toxine qu'il contenait 2 heures après le moment où le courant d'arrivée a été interrompu (section au creux poplité). En comparant le résultat de l'insertion du sciatique du cobaye n° 2, sectionné au creux poplité 15 minutes avant son ablation, avec le cas du cobaye n° 1, le témoin, on voit que ce court espace de temps a suffi pour que le nerf se débarrasse d'une partie de sa toxine et pour que son inoculation ne soit plus mortelle pour la souris.

Le déplacement de la toxine dans le neurone périphérique est cellulipète ; de plus il est exclusivement cellulipète. Pour le démontrer, nous pouvons injecter la toxine dans la moelle lombaire du cobaye, puis, une fois le tétanos généralisé, inoculer le sciatique à des souris.

Expérience VIII.

On injecte 1 goutte d'une solution concentrée de tétanine, représentant 10 doses mortelles, dans le renflement lombaire de la moelle d'un cobaye.

L'animal meurt en moins de 24 heures avec des symptômes

tétaniques généralisés. L'inoculation aux souris donne les résultats suivants pour les nerfs, la moelle épinière et le sang :

SOURIS INOCULÉE AVEC	1	2	3	4	5	6	7
N. sciatique.	0	0	0	0	0	0	0
N. brachial.	0	0	0	0	0	0	0
Moelle dorsale (1 centim. de long).	0	=	≡	≡	+		
Moelle lombaire (1 centim.)	=	+					
Sang 0,5 c. c.	—	=	+				

Cette expérience démontre que *la tétanine ne diffuse pas dans le cylindraxe après son injection au niveau du centre cellulaire*, tout au moins en ce qui concerne le neurone périphérique : car, dans la moelle, on trouve la toxine tétanique non seulement au point où elle a été injectée, mais encore au-dessus.

Le courant cellulipète de la tétanine est par conséquent le seul qui se fasse dans la substance cylindraxile du neurone périphérique.

Lorsque, au lieu de prélever le sciatique quelques heures après une injection dans la patte, on attend que l'animal présente des symptômes tétaniques généralisés, on peut constater par l'inoculation que le sciatique du côté opposé à l'injection de la tétanine renferme, lui aussi, de la toxine, bien qu'en plus faible quantité.

L'expérience ci-dessus nous ayant démontré l'absence d'un courant descendant de diffusion, nous sommes conduits à admettre que le nerf a puisé la tétanine en circulation dans les humeurs par ses expansions périphériques ou par les étranglements annulaires disposés le long des filets nerveux.

L'expérimentation va nous permettre de préciser ce dernier point.

Expérience IX.

Deux cobayes subissent la section du sciatique de la patte gauche, l'un au creux poplité, l'autre au niveau de l'échancrure sciatique. Chacun d'eux reçoit ensuite dans la patte opposée, la patte droite, 10 doses mortelles de tétanine. Après 24 heures,

les symptômes tétaniques sont généralisés : on tue les deux cobayes et on prélève leurs sciatiques gauches, un sciatique droit et le nerf brachial, qui sont inoculés à des souris. La portion de nerf réséquée chez le cobaye 1 est donc la même que chez le cobaye 2, celle qui va du jarret à l'échancrure sciatique.

25 AOUT 1902	24 HEURES APRÈS inoculation à des souris.	27	28	29	30	31		
Cobaye 1 inoculé avec 10 doses dans la patte droite, après section du sciatique gauche dans l'échancrure.	Sciatique droit.	—	=	=	≡	+		
	Sciatique gauche.	0	0	0	0	—	—	—
	Brachial.	0	0	0	0	0	0	0
Cobaye 2 inoculé comme le cobaye 1, après section du sciatique gauche au creux poplité.	Sciatique gauche.	0	0	0	0	0	0	0

Le sciatique sectionné à l'échancrure renfermait donc de petites quantités de toxine; le sciatique sectionné au creux poplité n'en contenait pas de quantités appréciables; enfin, le sciatique témoin du côté correspondant à l'inoculation de la tétanine a donné un tétanos mortel à la souris. Nous devons ainsi penser que seule l'absorption par les terminaisons périphériques joue un rôle important dans la pénétration du nerf par la tétanine. Comme il s'agit d'un point très éloigné du lieu d'injection, il est évident que la tétanine provient ici des humeurs en circulation.

Dans l'expérience relatée plus haut, on a vu que l'inoculation à la souris du nerf brachial du cobaye n'avait été suivie d'aucun effet. Cela ne signifie pas que le nerf ne renfermait pas de toxine, mais seulement que la quantité fixée était trop faible pour provoquer des manifestations tétaniques chez la souris.

Il résulte, en effet, de la même expérience que tout filet nerveux doit absorber la tétanine en circulation dans les humeurs, et la transporter de ses terminaisons périphériques jusqu'au centre médullaire. Si l'absorption n'est pas prédominante dans une certaine zone d'innervation (comme cela se produit quand on injecte la tétanine dans un muscle), les symptômes sont géné-

ralisés d'emblée, car ils n'apparaissent que si l'ensemble des neurones renferme une quantité suffisante de tétanine.

Voilà pourquoi si, au lieu d'inoculer un seul nerf sciatique, on insère sous la peau de la même souris les deux sciatiques et les nerfs brachiaux, on constatera la présence de la tétanine même lorsque l'inoculation aura été faite ailleurs que dans un membre, par exemple dans le corps vitré ou dans le testicule.

Expérience X.

Deux cobayes reçoivent chacun 10 doses de tétanine, l'un dans le corps vitré, l'autre dans le testicule. Après 24 heures, les animaux étant en plein tétanos généralisé, on les sacrifie et on inocule à des souris quelques-uns de leurs nerfs et un peu de sang.

COBAYES	SOURIS inoculées avec	1	2	3	4	5	6
	1 n. sciatique.	0	0	0	0	0	0
Inoculation intratesticulaire.	1 n. — / 2 n. brachiaux.	0	—	=	=	=	=
	0,5 c. c. sang.	≡	+				
Inoculation dans le corps vitré.	2 n. sciatiques. / 2 n. brachiaux.	—	—	—	—	—	—

Cette expérience prouve que *l'absorption de la toxine par les nerfs périphériques est un phénomène constant et qui n'exige pas, pour se produire, de lésion de neurone périphérique.*

D'autre part, il ressort jusqu'à l'évidence de la comparaison des expériences IX et X, avec l'expérience de M. Meyer, que le degré de concentration de la solution de toxine au niveau des terminaisons nerveuses périphériques influence directement l'absorption par le nerf.

CONCLUSIONS

L'absorption de la tétanine par les nerfs périphériques est la conséquence d'une affinité spécifique pour la substance cylindraxile. Cette affinité, qui n'apparaît pas dans les expériences *in vitro*, contrairement à ce qu'on observe avec la moelle ou avec

le cerveau, peut être mise en évidence avec la plus grande facilité par les expériences *in vivo*. La fixation de la tétanine sur les nerfs se fait très rapidement; elle présente le caractère particulier de n'être pas stable : nous avons en effet montré que la toxine tétanique une fois fixée se déplace dans le sens cellulipète avec une rapidité relativement faible. Cette circulation cylindraxile a pour effet de transporter la tétanine diluée dans les humeurs jusqu'à la cellule ganglionnaire.

Dans un mémoire ultérieur, nous chercherons à établir le rôle respectif des différents neurones dans cette fixation et dans ce transport de la toxine.

Un grand nombre de points sont encore obscurs dans l'absorption de la toxine tétanique: néanmoins nous croyons pouvoir formuler les hypothèses suivantes.

Injectée dans un muscle ou dans une région peu éloignée d'une masse musculaire, la toxine se répand dans la sérosité qui imprègne les tissus et passe en partie dans le sang où on la retrouve de très bonne heure. Dans la zone d'inoculation, la sérosité chargée de toxine s'est trouvée en contact avec les expansions nerveuses. Les nerfs moteurs ainsi que les nerfs vaso-moteurs l'absorbent et s'en remplissent à tel point qu'en un temps relativement court la substance du nerf périphérique en contient des quantités infiniment plus considérables que les humeurs qui baignent les tissus, à quelque distance du point d'absorption. La diffusion de la toxine suit une voie centripète : il s'agit d'un véritable mouvement de propagation que l'on pourrait comparer à l'absorption des liquides nourriciers par les racines d'une plante. La proportion de toxine contenue dans la lymphe au point d'injection reste pendant un certain temps (24 heures au moins) supérieure à la proportion contenue dans le sang, et par conséquent dans la lymphe en des points différents du corps. L'absorption par les filets nerveux de la région inoculée est donc pendant 24 heures supérieure à celle qui se produit dans les autres régions. Le neurone moteur correspondant sera par conséquent le premier saturé par la toxine, et cette saturation se manifestera par une contracture localisée, par un tétanos local. Cependant, en d'autres régions, les terminaisons nerveuses auront absorbé une certaine quantité de toxine, puisée au sein de la lymphe, quantité suffisante pour rendre sensible

la souffrance de leurs neurones d'origine : c'est alors qu'au tétanos local succédera le tétanos généralisé.

Nous ne sommes pas encore en état de décider si la tétanine est susceptible en outre de passer du neurone périphérique au neurone central, avec lequel il s'articule, et si les contractures sont attribuables à l'action de la toxine sur l'un ou l'autre de ces deux éléments cellulaires.

Dans l'absorption d'une toxine, il faut considérer non seulement le nombre des éléments absorbants, mais aussi la concentration de la solution de toxine : or cette concentration est toujours beaucoup plus considérable au point d'inoculation que dans les autres régions du corps, où la toxine ne diffuse que très diluée dans la masse du sang.

Cette absorption prépondérante par les filets nerveux de la région inoculée explique pourquoi l'injection, en plusieurs points du corps, d'une dose non mortelle de tétanine, provoque l'apparition d'un tétanos plus précoce et plus sévère que l'inoculation en un seul point.

Quand, au lieu d'injecter la toxine sous la peau ou dans le muscle, on l'introduit directement dans le sang ou dans un viscère, les symptômes tétaniques n'apparaissent que lorsque les neurones moteurs ont puisé dans le sang la toxine en circulation. Alors la tétanine atteint tous les neurones moteurs dans le même état de dilution, et ceux-ci l'absorbent simultanément, ce qui explique le début plus tardif des contractures et leur généralisation d'emblée dans le tétanos splanchnique.

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE DES SÉRUMS PRÉCIPITANTS

Par le Dr A. FALLOÏSE

(Travail du laboratoire de physiologie de l'Université de Liége.)

Bordet (1), en injectant du sang défibriné de poule à des lapins, constata, dans le sérum des lapins ainsi injectés, l'apparition de trois propriétés nouvelles : le sérum est, vis-à-vis du sang de poule, agglutinant, globulicide et précipitant, c'est-à-dire qu'il produit, mélangé avec du sérum de poule, un précipité plus ou moins abondant. Tchistovitch (2) étudia cette propriété précipitante. Il constata que des lapins injectés de sérum de cheval donnent un sérum qui trouble et précipite le sérum du cheval; le sérum des lapins injectés de sérum d'anguille trouble et précipite le sérum d'anguille.

Nolf (3) étudia le phénomène de plus près. Il démontra d'une façon irréfutable que le pouvoir précipitant était dû au sérum ou au plasma seuls, et que les globules rouges ne jouaient aucun rôle dans sa production. Ce résultat acquis, il poussa plus loin l'analyse. Le sérum est une solution de divers albuminoïdes encore mal connus. On peut en extraire un groupe, facile à précipiter, appelé « globuline », un autre plus soluble appelé « albumine » ou *sérine*.

Le pouvoir précipitant est-il dû à l'un ou à l'autre de ces groupes d'albuminoïdes, ou à tous deux à la fois?

Pour résoudre cette question, Nolf s'adressa au sérum de cheval.

Il en sépara la globuline par saturation au sulfate de magnésie à 30° et filtration, l'albumine, en ajoutant 1 0/0 d'acide acétique au filtrat après refroidissement.

Après une dialyse de 8 jours dans l'eau chloroformée, les solutions de globuline et d'albumine sont injectées à des lapins, chaque lapin recevant 5 injections à 8 jours d'intervalle.

Nolf constata alors que, seul, le sérum des lapins injectés de la solution de globuline trouble et précipite le sérum du cheval. Il trouble également les solutions de globuline et laisse limpides les solutions d'albumine. Le sérum des lapins ayant reçu en injections la solution d'albumine ne trouble ni le sérum de cheval, ni les solutions de globuline, ni celles d'albumine. Nolf en concluait « que la réaction précipitante est la réponse de l'organisme à l'injection d'une catégorie bien déterminée de substances albuminoïdes du sang, que c'est la globuline seule qui la produit, à l'exclusion de l'albumine ».

Leblanc (4) reprit le procédé imaginé par Nolf. Il injecta à des lapins des solutions de globuline et des solutions d'albumine provenant du sang de vache.

Il précipitait les globulines par demi-saturation au sulfate ammonique, la sérine par saturation au moyen du même sel ; mais, au lieu d'injecter toutes les globulines comme le faisait Nolf, il injectait uniquement les pseudo-globulines, l'euglobuline étant précipitée par une dialyse prolongée. Les lapins recevaient environ 8 injections.

Il constata, comme Nolf, que le sérum des lapins ayant reçu des injections de globulines de vache provoque, dans le sérum de vache, un trouble manifeste après quelques minutes et un dépôt notable après quelques heures. Mais le sérum des lapins injectés d'albumine produisait, à l'inverse de ce que Nolf, après un petit nombre d'injections, il est vrai, avait constaté : un trouble et un précipité dans le sérum de vache, lesquels étaient même plus importants que ceux que donnait le sérum des lapins injectés de globuline. La spécificité de ces sérums précipitants quant à l'espèce animale était absolue. L'immun-sérum ne donnait aucun trouble, ni avec le sérum de cheval, ni avec ceux de mouton, de cochon, etc. La spécificité n'était pas moins nette vis-à-vis des différents protéides du sérum de vache : le sérum du lapin injecté de pseudo-globulines laissait parfaitement limpides les solutions d'albumines, tandis qu'il troublait énergiquement les solutions d'euglobulines.

Le sérum du lapin injecté d'albumines laissait parfaitement limpides les solutions de pseudo-globulines et troublait énergiquement les solutions d'albumines.

Si ce résultat était exact, on posséderait un procédé facile et

précis pour déceler la nature chimique des albuminoïdes en solution.

Aussi Leclaincke et Vallée (5) tentèrent-ils d'appliquer ce procédé à la clinique, pour le diagnostic de la nature chimique des albuminoïdes de l'urine dans les néphrites. Ils injectèrent, pendant 3 mois, à des lapins une urine chargée de sérum. Le sérum de ces lapins précipite la sérine dans l'urine; il ne provoque aucun trouble dans les urines contenant de la globuline.

Linossier et Lemoine (6) reprirent l'étude de ces différents points. Ils constatèrent d'abord que la spécificité quant à l'espèce n'est pas absolue, mais la sensibilité de la réaction diffère : « Les précipités obtenus sont en général d'autant moins volumineux que l'animal dont on étudie le sérum est plus éloigné, dans l'échelle des êtres, de celui dont le sérum a servi à faire les injections. »

Ces deux auteurs (7) reprirent alors l'expérience fondamentale de Nolf, consistant à injecter séparément les divers albuminoïdes du sérum. Ils précipitèrent la globuline du sérum de cheval très légèrement acidifié par l'acide acétique en y ajoutant 6 parties d'une solution de sulfate ammonique. Le liquide, filtré, contenait la sérine. Après injections répétées à des lapins, ils constatèrent que le sérum des lapins ayant reçu de la sérine acquiert le pouvoir précipitant, mais à un degré bien moindre que le sérum des lapins ayant reçu des injections de globuline. L'action de ces sérums n'est pas spécifique; tous deux précipitent la globuline. Même, le sérum obtenu au moyen des injections de sérine précipite plus nettement la globuline que la sérine.

Michaélis (8), en injectant de la globuline seule, obtient une précipitine n'agissant que sur la globuline. En injectant de l'albumine, il obtient une précipitine agissant aussi bien sur la globuline que sur l'albumine.

Rostoski (9) sépare la globuline de l'albumine dans le sérum du cheval par demi-saturation au sulfate ammonique. Il ne constate non plus aucune spécificité quant à la nature chimique des albuminoïdes. Les lapins injectés de globuline ou d'albumine donnent un sérum qui précipite également bien tout les albuminoïdes du sérum de cheval.

Enfin, Umber (10) applique le même procédé aux albuminoïdes du blanc d'œuf. Il constate que les lapins injectés soit de

globulines, soit d'albumines de l'œuf, donnent un sérum qui précipite les solutions de globulines de l'œuf, mais qui ne trouble nullement les solutions d'ovalbumine.

Nous nous sommes demandé si les différences dans les résultats, suivant les expérimentateurs, n'étaient pas dues soit à l'origine des sérums employés (cheval ou vache), soit aux procédés chimiques utilisés pour séparer les globulines et les albumines, soit encore au nombre des injections, ou bien à la façon de chacun d'observer la réaction précipitante.

La question a bien son importance, puisque, d'une part, d'après Leblanc, on posséderait un moyen nouveau et très sensible pour distinguer les globulines des albumines; d'autre part, se basant sur la spécificité de la réaction précipitante vis-à-vis du sérum injecté, on se sert du procédé, en médecine légale, pour reconnaître le sang humain. Nous nous sommes adressés à du sérum de cheval et à du sérum de bœuf. Dans chacun d'eux, nous avons précipité les globulines et les albumines au moyen des procédés employés par Nolf et par Leblanc, les deux auteurs dont les résultats sont les plus différents.

A cet effet, la moitié du sérum de cheval dont nous disposions est saturée à 30°, au moyen de sulfate de magnésie. On filtre, le précipité est redissous dans l'eau distillée et reprécipité deux fois. Théoriquement, on obtient ainsi une globuline totalement exempte de sérine. Les albumines sont précipitées du filtrat en ajoutant 1 0/0 d'acide acétique après refroidissement et éloignement de l'excès de sulfate. Une moitié du sérum de bœuf est traitée de la même facon.

L'autre moitié du sérum de cheval, de même que celle du sérum de bœuf, est débarrassée des globulines par demi-saturation au sulfate ammonique. Le précipité est repris par l'eau distillée et reprécipité deux fois. Les albumines sont précipitées du filtrat par saturation au sulfate ammonique. Toutes ces opérations sont faites avec le plus grand soin.

Tous les précipités sont soumis à la dialyse dans l'eau chloroformée pendant 8 jours, additionnés de 1 0/0 de NaCl, et conservés sur une couche de chloroforme. La teneur en albuminoïdes est déterminée au polarimètre. 5 à 10 c. c. de ces solutions sont injectés à des lapins à 7 jours d'intervalle pendant 2 mois. Chaque lapin reçoit de la sorte 8 injections. Avant les

	SÉRUM de cheval.		SOLUTION de globulines de cheval préparées par $MgSO^4$.		SOLUTION de globulines de cheval préparées par demi-saturation $(NH^4)^2SO^4$.		SOLUTION d'albumines de cheval préparées par $MgSO_4$ + ac. acétique.		SOLUTION d'albumines de cheval préparées par saturation $(NH^4)^2SO^4$.		SÉRUM de bœuf.		SOLUTION de globulines de bœuf.		SOLUTION d'albumines de bœuf.	
	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.
Sérum lapins injectés de *globulines* de cheval préparées par saturation au $MgSO^4$.	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Presque rien.	Presque rien.	Rien.	Rien.
Sérum lapins injectés de *globulines* de cheval préparés par demi-saturation au $(NH^4)^2SO^4$....	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Rien.	Presque rien.	Rien.	Rien.
Sérum lapins injectés d'*albumines* de cheval préparées par $MgSO^4$ + ac. acétique..........	Trouble léger.	Dépôt faible.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt très faible.	Rien.	Presque rien.	Rien.	Rien.
Sérum lapins injectés d'*albumines* de cheval préparées par saturation au $(NH^4)^2SO^4$..... .	Trouble peu intense.	Dépôt faible.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt très faible.	Rien.	Presque rien.	Rien.	Presque rien.

	SÉRUM de bœuf.		SOLUTION de globulines de bœuf préparées par $MgSO^4$.		SOLUTION de globulines de bœuf préparées par demi-saturation $(NH^4)^2SO^4$.		SOLUTION d'albumines de bœuf préparées par $MgSO^4$ + ac. acétique.		SOLUTION d'albumines de bœuf préparées par saturation $(NH^4)^2SO^4$		SÉRUM de cheval.		SOLUTION de globulines de cheval.		SOLUTION d'albumines de cheval.	
	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire,	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaice.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.	Ap. 2 h. à l'étuve 37°.	Ap. 24 h. tempér. ordinaire.
Sérum lapins injectés de *globulines* de bœuf préparées par saturation au $MgSO^4$	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Trouble très léger.	Dépôt très faible	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Rien.	Dépôt très faible.	Rien.	Rien.
Sérum lapins injectés de *globulines* de bœuf préparées par demi-saturation au $(NH^4)^2SO^4$....	Trouble très intense.	Dépôt très abondant,	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très intense.	Dépôt très abondant.	Trouble très léger.	Dépôt très faible	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Rien.	Dépôt très faible.	Rien.	Rien.
Sérum lapins injectés d'*albumines* de bœuf préparées par $MgSO^4$ + ac. acétique	Trouble léger.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble très léger.	Dépôt très faible.	Rien.	Presque rien.	Rien.	Presque rien.
Sérum lapins injectés d'*albumines* de bœuf préparées par saturation au $(NH^4)^2SO^4$.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant.	Trouble peu intense.	Dépôt peu abondant	Trouble assez intense.	Dépôt assez abondant	Presque rien.	Presque rien.	Rien.	Rien.	Rien.	Rien,

injections, on a pris aseptiquement à chaque lapin environ 30 c. c. de sang dont on recueille les sérums pour servir de témoins.

Pour étudier la réaction précipitante, on mélange énergiquement, dans de très petits tubes à réaction, 1 volume de sérum de cheval ou de bœuf ou 1 volume des solutions de globulines ou d'albumines, à 2 volumes du sérum actif d'une part et à 2 volumes du sérum témoin d'autre part. Parfois, on observe avec le sérum actif un trouble au moment même du mélange; parfois, il ne se produit rien, le trouble ne survenant que plus tard. Quoi qu'il en soit, tous les tubes sont mis à l'étuve à 37° pendant 2 heures, puis examinés. On les laisse alors au repos pendant 24 heures à la température du laboratoire, puis on les observe de nouveau. Les sérums-témoins, dans ces conditions, ne produisent ni trouble ni précipité dans les sérums de bœuf et de cheval, ni dans les diverses solutions d'albuminoïdes.

Les résultats ont été très nets. Disons tout d'abord que, quelle que soit l'origine du sérum (cheval ou bœuf), quel que soit le mode de séparation des substances albuminoïdes, les résultats sont identiques. Nous les avons groupés dans le tableau ci-contre.

Le sérum des lapins injectés de globulines de cheval, ajouté, soit à des solutions de globulines de cheval, soit à du sérum de cheval, y détermine un trouble intense, qui se dépose en un précipité abondant. Ajouté à des solutions d'albumine de cheval, il y détermine un trouble à peine appréciable et un dépôt très faible. Ajouté à du sérum de bœuf ou à des solutions de globulines de bœuf, il produit après 24 heures un dépôt extrêmement faible; ajouté à de l'albumine de bœuf, il ne produit rien.

Le sérum des lapins injectés de globulines de bœuf se comporte de la même façon, c'est-à-dire précipite fortement les solutions de globulines et le sérum de bœuf, très faiblement les autres liqueurs.

Le sérum des lapins injectés d'albumine de cheval détermine un trouble et un précipité manifeste, mais peu abondants dans le sérum de cheval. Il détermine également un trouble peu abondant dans les solutions d'albumines du cheval et un trouble identique dans les solutions de globulines du cheval. Il ne produit qu'un dépôt extrêmement faible dans le sérum du bœuf et

dans les solutions de globulines provenant de ce sérum; il ne produit rien dans les solutions d'albumine.

Il en est de même pour le sérum des lapins injectés d'albumine de bœuf.

On constate, en outre, que non seulement le sérum des lapins ayant reçu des injections de globuline possède un pouvoir précipitant beaucoup plus intense que celui des lapins ayant reçu l'albumine, mais que ce pouvoir précipitant se produit après un nombre moins grand d'injections. C'est ainsi que Nolf a obtenu le pouvoir précipitant après 5 injections de globuline, alors que 6 injections d'albumine ne donnent encore aucun résultat.

D'autre part, nous avons déjà mentionné que le sérum des lapins ayant reçu de l'albumine précipite les solutions d'albumine, mais précipite aussi, et au même degré, les solutions de globuline.

En présence de ces faits, deux explications sont possibles : l'albumine injectée aux lapins donne à leur sérum un pouvoir précipitant faible, demandant pour se produire un grand nombre d'injections, tandis que les injections de globuline leur confèrent un pouvoir précipitant énergique et se produisant rapidement; ou bien — et c'est pour nous l'explication la plus vraisemblable — les procédés classiques employés pour séparer les globulines et les albumines dans le sérum ne sont pas parfaits, les solutions d'albumine que l'on injecte contiennent des traces de globulines, et ce sont ces dernières qui, après des injections nombreuses, finissent par conférer au sérum du lapin un pouvoir précipitant peu énergique, et s'exerçant aussi bien sur les solutions de globulines que sur les solutions d'albumines impures.

C'est en revenir à la conclusion de Nolf, qui attribue à la globuline seule la propriété de faire naître le pouvoir précipitant.

Dans tous les cas, il résulte des expériences précédentes que la réaction précipitante ne nous fournit pas un procédé permettant de différencier sûrement, dans des solutions, les globulines des albumines. Il en résulte encore, comme l'avait déjà constaté Linossier, que la spécificité, quant à l'espèce animale, n'est pas absolue, puisque le sérum des lapins injectés de globulines de cheval, par exemple, précipite, bien que très faiblement, le sérum du sang de bœuf.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bordet, Agglutination et dissolution des hématies, *Annales Pasteur*, 1899.

2. Tchistovitch, Etude sur l'immunisation par le sérum d'anguilles, *Annales Pasteur*, 1899.

3. Nolf, Contribution à l'étude des sérums antihématiques, *Annales Pasteur*.

4. Leblanc, Contribution à l'étude de l'immunité acquise, *La Cellule*, t. XVIII.

5. Leclainche et Vallée, Note sur les anticorps albumineux, *Comptes rendus Soc. Biologie*, 1901, p. 51.

6. Linossier et Lemoine, Sur les substances précipitantes des albumines (précipitines) contenues dans certains sérums spécifiques, *Comptes rendus S. de Biologie*, 1902.

7. Linossier et Lemoine, Sur la spécificité des sérums précipitants, *idem*, p. 369.

8. Michaelis, *Verhandlungen des Vereins fur innere Medicin*, 24 mars 1902.

9. Rostoski, Ueber den Werth der Präcipitine als Unterscheidungsmittel fur Eiweisskörper, *Muenchen. medicin. Wochenschrift*, 1902.

10. Umber, Zur Chemie und Biologie der Eiweisskorper, *Berlin. Klin. Wochens.*, 1902, p. 657.

ÉTUDES SUR LA PESTE

RECHERCHES
Sur la durée de la présence du microbe de la peste
Injecté vivant dans les veines du cheval

PAR CAROUGEAU, VÉTÉRINAIRE (INSTITUT PASTEUR DE NHA-TRANG, ANNAM)

(Travail de l'Institut Bactériologique de Nha-Trang, Annam.)

Le sérum antipesteux est fourni par des chevaux immunisés contre le bacille de la peste.

Les recherches faites à l'Institut Pasteur de Paris, sous la direction de M. Roux, ont montré que le cheval est très sensible au virus pesteux, qu'il est facilement tué par de faibles doses, mais aussi qu'il peut être progressivement immunisé et amené à supporter des quantités de virus qui égalent plusieurs centaines de fois la dose primitivement mortelle.

Il a été établi en même temps que l'on obtient un sérum antipesteux plus actif, quand on injecte aux producteurs des microbes vivants et virulents.

Les bacilles sont détruits dans le sang (phagocytés), et le résultat de la réaction de l'organisme est la production de substances qui donnent à son sérum des propriétés nouvelles, préventives, et curatives vis-à-vis de l'infection pesteuse.

Il était intéressant de rechercher expérimentalement combien de temps les microbes ainsi injectés restent vivants dans le sang et s'ils sont atténués avant de disparaître.

Chargé depuis deux ans de la préparation du sérum antipesteux à l'Institut Pasteur de Nha-Trang, cette question avait pour moi un intérêt particulier.

Les chevaux producteurs de sérum ne peuvent être entretenus en permanence à Nha-Trang, le laboratoire étant situé au

bord de la mer, sur une dune de sable privée de tout pâturage.

Ils doivent être renvoyés après chaque inoculation dans une plantation annexe, située à 18 kilomètres, où ils trouvent en assez grande abondance l'herbe qui leur est indispensable.

Il était donc important de savoir si ces animaux peuvent être dangereux après avoir reçu le bacille de la peste, pendant combien de temps leur sang contient ce microbe vivant et virulent.

Ces recherches me permettaient de déterminer la durée minima du séjour de mes animaux à Nha-Trang.

Elles me permettront aussi de répondre aux détracteurs du sérum antipesteux qui ont prétendu que ce liquide pouvait donner une peste atténuée[1].

Mes expériences ont été faites sur des chevaux immunisés depuis longtemps, c'est-à-dire pouvant supporter des doses énormes du microbe de la peste.

Il est impossible de faire ces recherches sur des animaux neufs : ceux-ci, très sensibles au poison pesteux, sont tués par des doses très faibles de bacilles vivants[2].

Mais lorsqu'un cheval a reçu pendant un temps assez long (plusieurs mois) des doses progressivement croissantes de culture, il ne présente plus, même à la suite d'injections considérables, de réaction sensible. Il semblerait donc que les animaux amenés à ce degré d'immunité ont acquis le pouvoir de fixer et de détruire rapidement le microbe et sa toxine. Nous verrons que l'expérience prouve le contraire.

1. Voir en particulier à ce sujet l'article du Dr Leroux (*Gazette hebdomadaire*, 1901, p. 1172), sur les accidents consécutifs aux injections de sérum antipesteux faites aux passagers du *Sénégal* pendant leur séjour au Frioul. Dans un cas unique, sur 133 injectés, un médecin observa sur sa femme, après une injection de 7 c. c. de sérum antipesteux sous la peau du flanc droit : douleur de la fosse iliaque, traînées de lymphangite, gonflement considérable d'un ganglion inguinal, fièvre, faiblesse générale, prostration, etc., etc... Ce médecin attribue ces accidents non à une infection par une aiguille ou une seringue mal aseptisées, mais au sérum qui aurait donné une peste atténuée!!... Cette conclusion est d'autant plus extraordinaire que le sérum anti-pesteux avait subi trois chauffages à 58°.

2. Exemple : Un cheval australien de 1m.56, âgé de 14 ans environ, reçoit à 6 heures du matin dans la jugulaire le râclage de 2 tubes de culture de peste sur gélose; sa réaction est vive : à 11 heures sa température est de 40,01, il est très abattu, refuse de manger; à 5 heures du soir T. 40,08. L'abattement et la fièvre persistent le lendemain; pendant la journée l'animal reste couché, il est comateux à 6 heures du soir et meurt dans la nuit.

Des prises de sang faites à la jugulaire permettent de retrouver le microbe de la peste, virulent pour le rat.

Le cadavre est brûlé sans avoir été ouvert.

Avant d'entrer dans le détail de ces recherches il est indispensable de donner les caractères du microbe utilisé.

Caractères du bacille.

Il provient de l'épidémie de peste de Nha-Trang, 1898.

Depuis cette époque il a été conservé en cultures, successives sur gélose.

Les repiquages sont faits assez régulièrement, au moins une fois par semaine.

Peu à peu, ce bacille pesteux s'est habitué à la gélose, il y pousse très rapidement à la température ambiante, qui varie de 26 à 32°.

Au bout de 24 heures les colonies apparaissent, très visibles, en un fin pointillé bleuâtre qui augmente jusqu'à former des colonies assez épaisses, blanchâtres, translucides, sans tendance à s'étendre. A la température ordinaire, les cultures se font mieux qu'à l'étuve à 37-38°.

Les températures élevées, 42-44°, retardent la pullulation des bacilles pesteux.

Ces températures sont dysgénésiques : il semble que les microbes les moins virulents sont tués, et que les colonies qui se forment sont entièrement constituées par les bacilles dont la vitalité, par conséquent la virulence, est la plus grande.

La culture à températures élevées est donc un moyen de faire une sélection et conserver des cultures virulentes.

On constate que des cultures sur gélose abandonnées à l'air s'affaiblissent peu à peu, mais tous les microbes qui constituent une culture ne subissent pas également l'action atténuante du vieillissement.

Ceux qui se trouvent dans les couches profondes gardent plus longtemps leur activité, car ils sont préservés de l'action oxydante de l'air par des couches superficielles.

Aussi, quand on réensemence une culture âgée sur un milieu neuf, on obtient une culture jeune, composée en proportion variable de microbes virulents et de microbes atténués.

Le chauffage à 44° permet d'éliminer tous les microorganismes atténués, de *sélectionner* des colonies virulentes et d'obtenir une abondante culture de bacilles très actifs.

Exemple : Une culture ancienne de peste, âgée de 6 mois

environ, est repiquée largement sur deux séries de tubes de gélose.

Les uns sont placés à la T. ordinaire de la chambre, ils donnent, en 24 heures, des colonies abondantes, transparentes, caractéristiques, couvrant toute la surface qui a été touchée par le fil de platine.

Les autres, mis dans l'étuve réglée à 44°, ne montrent au bout de 24 heures que de rares et fines colonies, 2, 3, 5 par tube.

Ces colonies, repiquées sur de la gélose neuve qui est aussi placée dans l'étuve à 44°, fournissent en 24 heures des cultures plus abondantes après 3 passages ; les cultures à 44° sont en 24 heures presque aussi belles que celles de la première série aites à la T. ordinaire,

Une inoculation d'épreuve montre la différence d'activité des deux séries de cultures.

1re *Série :* 4 rats inoculés par piqûre sous-cutanée meurent en 54, 108, 120, 134 heures.

2e *Série :* 4 rats inoculés par la même méthode meurent en moins de 48, 50, 54 et 72 heures.

La différence est évidente.

Les rats de la première série ont reçu des microbes virulents en petit nombre, dilués qu'ils étaient par des germes peu actifs.

Ceux de la seconde n'ont reçu que des germes très virulents.

Cette expérience répétée à dix reprises différentes a toujours donné les mêmes résultats.

C'est à l'aide de ce procédé que je puis conserver un virus sensiblement fixé, tuant le rat, par piqûre sous-cutanée, en 48 à 60 heures. Ce microbe sert pour les injections chez les chevaux producteurs de sérum.

Production du sérum antipesteux.

Des cultures sont faites sur gélose dans les boîtes modèle de M. Roux.

Au bout de 48 heures, à la température ordinaire, elles sont abondantes.

Un de leurs caractères constant est d'avoir avec la gélose une *très faible adhérence.*

Si l'on introduit dans la boîte quelques centimètres cubes d'eau stérilisée, les colonies microbiennes se détachent et flottent comme un voile à la surface du liquide.

Quelques mouvements brisent ce voile et la dilution ainsi opérée est filtrée sur du coton, stérilisée, puis injectée.

Il me semble inutile d'entrer dans les détails de la technique de ces injections, extrêmement faciles, mais auxquelles il faut apporter quelque attention pour éviter de contaminer ses aides ou soi-même.

Chaque cheval immunisé contre la peste reçoit, avant d'être saigné, 4 injections consécutives à une semaine d'intervalle et correspondant à des doses progressivement croissantes de 1/4, 1/2, 3/4 et une boîte de culture sur gélose.

Les chevaux sont saignés dans la quinzaine qui suit la dernière injection.

Ils sont ensuite mis au repos pendant un mois et peuvent recevoir à nouveau du virus.

Recherche des bacilles pesteux.

J'ai procédé à la recherche des microbes dans le sang après l'injection de la quatrième semaine, c'est-à-dire la plus considérable.

J'ai fait des prises de sang à des intervalles de plus en plus éloignés de l'heure de l'injection, puis, j'ai recherché dans ce sang le bacille pesteux par l'examen microscopique, l'inoculation au rat, les cultures.

Prises de sang. — Elles ont été faites dans la jugulaire opposée à celle qui avait reçu l'injection, après avoir fixé convenablement le cheval, rasé les poils et désinfecté la peau.

La jugulaire est ponctionnée avec une grosse aiguille d'injecteur et le sang recueilli dans un tube à essai renfermant 1 à 2 c. c. de solution de citrate de soude, pour empêcher la coagulation du sang.

L'*examen microscopique* est un moyen défectueux pour la recherche des microbes dans le sang, il ne donne que des résultats incertains, les microbes étant trop rapidement dilués.

Pour les mettre en évidence, il faut employer l'inoculation

au rat ou la culture en bouillon ou sur plaque de gélose.

Peu de temps après l'injection, les bacilles pesteux, uniformément répartis dans la circulation générale, sont très abondants.

La moindre goutte de sang en contient.

Expérience. — Cheval n° 34.

Il reçoit dans la jugulaire gauche une culture sur gélose, diluée dans 20 c. c. d'eau stérilisée.

Au bout de 3 minutes, une prise de sang est faite dans la jugulaire droite, 10 tubes de gélose sont ensemencés aussitôt, chacun avec une anse dece sang.

Les tubes, examinés après plusieurs jours, montrent des colonies dans tous les points touchés par le fil de platine; c'est de la peste pure. 4 rats inoculés avec 1/2 c. c. du sang recueilli 3 minutes après l'injection meurent de peste.

Peu à peu les microbes deviennent moins nombreux.

Au bout de 10 minutes, 2e prise de sang; sur 10 tubes ensemencés avec une anse de sang, 7 seulement ont montré quelques colonies de peste.

Après 15 minutes, sur 10 tubes 3 seulement ont développé chacun 2 colonies de peste.

Après 30 minutes, sur 10 tubes aucun n'a fourni de culture.

Pourtant il existe encore dans le sang des bacilles libres et vivants, car des rats inoculés avec 1/2 c. c. sont morts de peste.

Autre expérience. — Cheval n° 75.

Il reçoit dans la jugulaire droite une culture sur gélose, diluée dans 20 c. c. d'eau stérilisée.

Les prises de sang sont faites à la jugulaire gauche après :

10 *minutes* : 10 tubes de gélose sont ensemencés avec une anse de sang; tous cultivent.

10 rats inoculés chacun avec 1/2 c. c. de sang; tous meurent de peste en 3 à 7 jours.

16 *minutes* : sur 10 tubes, 5 cultivent.

10 rats reçoivent 1/2 c. c. de sang et meurent en 3 à 9 jours.

30 *minutes* : sur 10 tubes, aucune culture.

Sur 10 rats inoculés avec 1/2 c. c. de sang, 2 meurent au bout de 4 jours, 2 en 6 jours, les autres ne sont pas morts.

Autre expérience. — Cheval n° 25.

Il reçoit à droite une boîte de culture sur gélose.

Prises de sang à gauche au bout de :

10 *minutes* : 6 tubes de gélose ensemencés avec une goutte de sang, 7 jours après tous ont de petites colonies de peste pure, 7 rats inoculés sous la peau avec 1 c. c. de sang meurent de peste en 3, 5, 6 et 7 jours. 6 tubes de gélose ensemencés avec 4 gouttes de sang chacun : *au bout de 7 jours*, 4 tubes ont donné de petites colonies de peste pure. 6 rats sont inoculés, l'un meurt en 4 jours ; le 2e en 5 ; les autres résistent.

Expérience. — Jument n° 84.

Inoculation : une boîte de culture à droite.

Prise de sang : 1 heure après dans la jugulaire gauche ;

4 rats inoculés avec 1/2 c. c. de sang meurent de peste en 6 jours. 4 tubes de gélose ensemencés avec 3 gouttes de sang, au bout de 7 jours, 1 seul a présenté des petites colonies qui, repiquées et inoculées au rat, lui ont donné la peste mortelle.

Expérience. — Cheval n° 4.

Injection : une boîte de culture à droite.

Prise de sang à gauche, 1 heure 1/2 après.

Deux boîtes de gélose et deux ballons sont ensemencés avec 10 c. c. de sang : il se développe d'abondantes cultures, qui, inoculées à 2 rats, les tuent en 72 et 80 heures.

Des témoins inoculés avec la culture primitive sont morts en 72 heures.

Ces expériences démontrent que les bacilles pesteux, très nombreux dans le sang immédiatement après l'inoculation, se raréfient rapidement, pourtant il en reste encore de vivants après 1 heure 1/2.

L'expérience suivante va nous montrer qu'on peut en retrouver à un moment encore plus éloigné de l'inoculation, mais ils doivent être recherchés dans une plus grande quantité de sang.

Expérience. — 3 chevaux, nos 4, 46, 47, reçoivent chacun une boîte de culture sur gélose ; ils sont saignés 2, 4, 6, 7 et 10 heures après l'inoculation, des ensemencements avec 2, 5 et 10 c. c. de sang sont faits sur boîte de gélose et dans des ballons de bouillon.

Le tableau suivant donne les résultats de l'expérience :

		Quantité de sang ensemencée	Temps écoulé depuis l'injection.						
			2h	3	4	5	6	7	10h
Ensemencements sur boite de gélose	Cheval n° 4.	2 c.c.	Cultures.	Cult.	Pas de cultures.				
		5 c.c.	Cultures.	Cult.	Pas de cultures.	Quelq. colonies.	Pas de cultures.		
		10 c.c.	Cultures.	Cult.	Cult.	Pas de cultures.	Cultures.		
	Cheval n° 46.	2 c.c.	Cultures.	Cult.	0	Pas de cultures.			
		5 c.c.	Cultures.	Cult.	Cult.	Cultures faibles.			
		10 c.c.	Cultures.	Cult.	Cultures faibles.				
	Cheval n° 47.	2 c.c.	Cultures.	Cult.	Pas de cultures.				
		5 c.c.	Cultures.	Cult.	Quelq. colonies.	Pas de cultures.			
		10 c.c.	Cultures.	Cult.	Cultures.				
Ensemencements en ballon de bouillon	Cheval n° 4.	2 c.c.	Cultures.	Cult.	Pas de cultures.				
		5 c.c.	Cultures.	Cult.	Cultures.				
		10 c.c.	Cultures.	Cult.	Cultures.				
	Cheval n° 46.	2 c.c.	Cultures.	Cult.	Pas de cultures.				
		5 c.c.	Cultures.	Cult.	Cultures.				Pas de cultures.
		10 c.c.	Cultures.	Cult.	Cultures.				
	Cheval n° 47.	2 c.c.	Cultures.	Cult.	Pas de cultures.				
		5 c.c.	Cultures.	Cult.	Pas de cultures.				
		10 c.c.	Cultures.	Cult.	Cultures.				

Ainsi, 10 heures après l'inoculation il peut encore exister des microbes vivants.

Ces bacilles sont virulents comme le montrent des inoculations faites avec le repiquage des cultures de 10 heures des chevaux n° 46 et 47.

Le 19 mai 1902 à 8 heures du matin : 5 rats sont inoculés avec la culture du cheval n° 46 (10 heures) ; ils meurent ; 1 le 22 mai à 7 heures, 3 le 23 dans la journée, 1 le 24.

5 rats inoculés avec la culture du cheval n° 47 (10 heures) meurent : 1 le 22 mai dans la nuit, 2 le 23, 1 le 24 et 1 le 25.

Deux témoins sont morts en 75 et 94 heures.

Tous ces rats ont montré le bacille de la peste à l'autopsie.

Plus on s'éloigne de l'heure de l'inoculation, plus les microbes se raréfient, aussi les résultats obtenus par l'injection sous-cutanée de sang au rat sont-ils de plus en plus incertains.

Ainsi après 10 heures, les rats ne succombent plus à des doses de 1/2, 2/5, 1 c. c. de sang.

Remarque intéressante, ils ne sont pas immunisés, car inoculés au bout d'une semaine, avec une culture virulente, ils meurent aussi vite que des témoins.

Les propriétés préventives n'apparaissent donc pas aussitôt après l'injection du virus.

Expérience. — Cheval n° 4.

Inoculation : une boîte de culture.

Saignée : 14 heures après.

Ensemencement avec 10 c. c. de sang de 1 boîte gélose et 1 ballon bouillon.

Il n'y pas eu de culture.

5 rats inoculés avec 2 c. c. de sang résistent : 8 jours plus tard ils reçoivent, ainsi que 2 témoins, une culture virulente âgée de 48 heures.

Les témoins meurent en 3 et 4 jours; les autres, 2 en 3 jours, 2 en 4 jours, 1 en 5 jours. A l'autopsie, le sang du cœur a donné pour tous des cultures de peste.

Cette expérience pourrait faire penser qu'après 14 heures il n'y a plus de microbes libres et vivants dans le sang.

Des recherches faites à une époque plus éloignée de l'inoculation ont montré des variations suivant les individus et suivant la dose injectée.

Un cheval n° 83 reçoit 4 boîtes de culture sur gélose, diluées dans 100 c. c. d'eau stérilisée.

Des saignées faites 20 et 40 heures après l'inoculation ont fourni des cultures de peste.

Chez certains chevaux, qui ont reçu seulement 1 boîte de culture, on retrouve encore, mais non d'une manière constante, des microbes 40 heures après l'inoculation.

Il semble que ce soit la limite.

Au delà de 40 heures, à 45 à 48 heures, je n'ai jamais retrouvé de bacille.

Je donne comme type des recherches à 40 heures les 2 expériences suivantes :

Chevaux n° 4 et n° 12.

Inoculations : 1 boîte de culture sur gélose.

Saignées : 40 heures après l'inoculation.

Ensemensements : 2 ballons bouillon chacun avec 10 c. c. de sang.

Au bout de quelques jours des cultures se sont développées, répiquées sur gélose, elles montrent les caractères de la peste.

8 rats inoculés par piqûre sous-cutanée avec un repiquage de 48 heures de chacune de ces cultures meurent tous : 5 en moins de 60 heures, 3 en moins de 72 heures.

L'examen microscopique du sang du cœur a montré le bacille en abondance.

Des témoins inoculés avec un repiquage de 48 heures de la culture qui avait servi à l'injection des chevaux n°s 4 et 12 sont morts en un temps plus long, 72, 80, 96 heures.

Il est remarquable que le microbe ainsi extrait de l'organisme du cheval reste virulent.

Il semblerait même que sa virulence ait augmenté. En réalité il n'y a pas eu augmentation de la virulence. Le résultat est tout à fait comparable à celui de la culture à haute température. Les microbes les moins virulents sont détruits les premiers par la phagocytose et ceux qu'on retrouve longtemps après l'inoculation sont les plus résistants, les plus virulents.

Quand le temps écoulé depuis inoculation dépasse 40 heures, les bacilles de la peste disparaissent définitivement de la circulation ou se raréfient tellement qu'on ne peut plus les mettre en évidence.

Après 45, 47, 48 heures, je n'en ai jamais retrouvé.

Expérience : chevaux nos 4, 12, 13, 24, 85.

Injections : chacun 1 boîte de culture sur gélose.

Saignées : 48 heures après l'inoculation.

On ensemence 20 c. c. de sang de chaque cheval dans des ballons de bouillon (1/2 litre).

Deux seuls cultivent; le microbe qui s'est développé n'est pas le bacille de la peste.

Une observation générale s'applique à toutes ces expériences, la détermination des microbes obtenus par la culture doit être faite minutieusement (par examen microscopique, réaction de Gram, inoculation au rat).

C'est qu'en effet, l'inoculation d'une forte dose de culture de peste affaiblit le pouvoir bactéricide du sang et favorise la pénétration dans la circulation de microbes étrangers, probablement d'origine intestinale. C'est une cause d'erreur à éviter.

CONCLUSIONS

I. La culture à température élevée, le passage par l'organisme du cheval des bacilles de la peste opèrent une véritable sélection des microbes virulents, les germes peu virulents étant détruits les premiers par la chaleur ou par les phagocytes.

II. 48 heures après l'inoculation intra-veineuse d'une boîte de culture sur gélose, tous les bacilles pesteux ont disparu de la circulation.

III. Le sérum obtenu 15 jours après la dernière inoculation de microbes vivants ne peut donner donc la peste même lorsqu'il est injecté à grandes doses.

NOTA. — Toutes ces expériences ont été faites sur des chevaux de race annamite, de petite taille, 1m,22 en moyenne, âgés d'au moins 5 ans.

DE L'INFLUENCE DE L'OXYGÈNE
Sur la Protéolyse en présence de chloroforme

Par G. MALFITANO

On sait que le chloroforme détermine, ou tout au moins favorise l'autoprotéolyse. Certaines cellules microbiennes, les éléments de certains tissus, ou des matières provenant d'un organisme exposé à l'action de ce réactif, subissent des modifications consistant dans la décoagulation et la désintégration des matières protéiques qui les composent.

Dans les conditions particulièrement favorables qu'on réalise en mettant la matière organisée en suspension dans l'eau chloroformée, on peut parfois suivre la marche de cette autodigestion et mettre en évidence l'agent de nature diastasique[1]. Le chloroforme, ainsi que d'autres antiseptiques, le toluol, le xylol, le phénol, le thymol et l'alcool faible, ne doivent agir qu'indirectement en créant les conditions favorables à l'autolyse. Par contre d'autres antiseptiques, le sublimé, le fluorure de sodium, le formol, etc., agissent en fixateurs.

Or le chloroforme, qui est très favorable à l'autoprotéolyse, l'empêche dans certains cas, en absence de l'oxygène.

Expérience I. — On prépare une émulsion de *bactéridies* charbonneuses en raclant une culture, en surface, sur gélose, âgée de 18 à 24 heures, et en délayant les corps microbiens dans 20 c. c. d'eau physiologique, et l'on distribue cette émulsion dans quatre tubes.

Toute l'opération est faite aseptiquement.

Le tube A, simplement bouché avec un tampon d'ouate, est placé à la température de 40°. Déjà au bout d'une demi-heure, la bactériolyse se manifeste, elle est assez avancée après 2 heures; à ce moment, une grande partie des cellules sont désagrégées, et les autres apparaissent en forme de chapelets dans les préparations colorées.

1. La bactériolyse de la bactéridie charbonneuse. *Comptes rendus de l'Ac. des Sciences*. T. CXXXI, p. 295.

Le tube B est scellé à la lampe, après qu'on l'a vidé d'air au moyen de la trompe. Les autres conditions étant égales d'ailleurs, la bactériolyse se manifeste un peu plus rapidement que dans le tube A.

Le tube C, bouché simplement à la ouate, reçoit une goutte de chloroforme. Après l'avoir agité, ce tube est placé dans les mêmes conditions que les précédents. La bactériolyse est, dans ce cas, particulièrement intense et rapide. Il ne reste plus dans ce tube, après 2 heures d'étuve, qu'un faible dépôt de débris informes.

Le tube D reçoit aussi une goutte de chloroforme, et il est scellé après extraction de l'air.

Le processus de bactériolyse ne se manifeste pas dans ce tube. Les cellules s'agglutinent à la longue, mais elles ne s'émiettent pas, et, bien que leur matière ait dû subir de faibles modifications qu'on remarque après coloration, elles restent intactes après des mois.

Cette expérience, répétée maintes fois, a donné toujours le même résultat, à la seule condition qu'on opère avec des cellules jeunes. Elle peut être réalisée avec les différentes races de bactéridies, qui, comme on sait, se bactériolysent plus ou moins vite. Le résultat ne change pas si, au lieu de faire le vide, l'on remplace dans le tube l'air par de l'hydrogène. D'autre part, le phénomène n'est pas le même avec les autres antiseptiques connus comme favorables à l'autolyse. Les essais que j'ai faits en me servant de xylol, toluol, phénol, thymol, cyanure de potassium, ont montré que l'absence de l'oxygène ne change pas l'action de ces réactifs sur les cellules.

J'ai recherché si la présence de l'oxygène était aussi nécessaire pour les autres digestions opérées en présence de chloroforme.

Expérience II. — On prend 4 grammes de fibrine de chien toute fraîche et non lavée qu'on partage en deux portions égales. Chacune de ces deux portions est mise en suspension dans 50 c. c. d'eau physiologique, additionnée d'un excès de chloroforme.

La portion A est contenue dans un petit ballon bouché avec de la ouate, qu'on maintient à 40° en l'agitant de temps en temps.

Après 24 heures déjà, les flocons de fibrine sont finement émiettés et au bout de 48 heures, il ne reste qu'un dépôt très fin et très léger.

La portion B est contenue dans un petit ballon qu'on a scellé après l'avoir vidé d'air. La fibrine, dans ce cas, reste en gros flocons, et le liquide se trouble fortement.

Après une semaine, on jette sur deux filtres tarés le contenu de chaque ballon. La portion A filtre très facilement et laisse un résidu qui, pesé sec, ne dépasse pas 0 gr, 007. La portion B filtre très lentement, et les flocons de fibrine restants, pesés à l'état sec, donnent 0 gr, 115

J'ai répété l'expérience plusieurs fois; en opérant avec la même fibrine de l'expérience précédente, qu'on avait gardée 36 heures à la glacière, le résultat a été moins net. La différence n'était pas bien saisissable, non plus, quand j'ai opéré avec de la fibrine de porc apportée de l'abattoir.

La nécessité de la présence de l'oxygène, pour mettre en train la digestion chloroformique de la fibrine, est très manifeste. Des expériences que j'ai faites sur l'autodigestion de la muqueuse stomacale et, en général sur des digestions opérées par la pepsine, il résulte d'une manière assez nette, que le chloroforme affaiblit considérablement la diastase et que, dans ces cas, l'absence de l'oxygène ne modifie pas la marche de la digestion. Il en est différemment pour le suc pancréatique.

Expérience III. — On prépare un mélange à parties égales de suc pancréatique inactif recueilli purement et de suc intestinal filtré; on en fait quatre échantillons pareils dans des tubes à essai, où l'on introduit des petits cubes d'albumine d'œuf stériles, et on les porte à l'étuve à 40°.

Le tube A est bouché avec de l'ouate; au bout de 18 heures, le cube d'albumine est presque complètement dissous, le liquide est clair.

Le tube B est scellé, vide d'air : la dissolution du cube d'albumine se fait dans les mêmes conditions que dans l'échantillon A.

Le tube C reçoit une goutte de chloroforme. Toutes choses étant égales d'ailleurs, la dissolution du cube d'albumine est plus lente et moins complète.

Le tube D est scellé, vide d'air, après addition d'une goutte

de chloroforme. Au bout du même temps le cube d'albumine est intact et seulement devenu plus transparent aux arêtes; après une semaine, il présente des crevasses : il s'est en partie désagrégé, mais la matière solide ne paraît pas diminuée.

J'ai répété l'expérience seulement précédente, en plaçant à l'étuve à 40° les quatre échantillons de suc pancréatique, sans les mettre en présence de la matière à digérer; après 10 heures je les ai retirés, j'ai ajouté à chaque essai un petit cube d'albumine et je les ai portés à l'étuve, tous étant dans les mêmes conditions, bouchés simplement avec de la ouate. Au bout de 24 heures, le résultat était analogue à celui de l'expérience III.

Des expériences que j'ai faites en opérant avec le suc pancréatique, il apparaît très manifestement que le chloroforme affaiblit la diastase, et que cette action nuisible est plus intense en l'absence de l'oxygène.

Dans les milieux albuminoïdes où se trouvent des protéases, ont lieu des phénomènes de coagulation et de décoagulation (selon les cas) et, souvent en même temps. Ces deux processus paraissent antagonistes, mais leurs agents n'ont pas été jusqu'à présent séparés, et leur mécanisme est encore fort obscur.

L'étude de l'influence du chloroforme dans des conditions variées sur les diastases d'une part, et sur la matière albuminoïde de l'autre, permettra, je crois, de pénétrer un peu la nature de ces phénomènes, et je me propose d'exposer dans une prochaine note les observations recueillies à ce propos.

(Je remercie MM. Delezenne et Frouin de m'avoir fourni les matériaux physiologiques employés dans cette étude.)

L'ALCOOL EST-IL UN ALIMENT?

REVUE CRITIQUE

ATWATER, WOODS et BENEDICT, Sur le métabolisme de l'azote et du carbone dans l'organisme, avec un calorimètre à respiration humaine d'une construction spéciale, *Office of Exper. Stations of the U. S. Depart of. agriculture*, n° 44. — ATWATER et ROSA, Description d'un nouveau calorimètre et expériences sur la conservation de l'énergie dans le corps humain, *id.*, n° 63. — ATWATER, BENEDICT, avec la coopération de MM. SMITH et BRYANT, Expériences sur le métabolisme de la matière et de l'énergie dans le corps humain, *id.*, n° 69. — ATWATER et BENEDICT, avec la coopération de MM. BRYANT, SMITH et SNELL, Nouvelles études sur le même sujet, *id.*, n° 109. — ATWATER et BENEDICT, Étude expérimentale concernant la valeur nutritive de l'alcool, *Mémoires de l'Académie nationale des sciences*, t. VIII, Washington, 1902.

L'alcool est-il un aliment, traversant le canal intestinal au même titre que la viande et le pain, et faut-il alors le traiter en ami, ou bien est-il un ennemi, qui blesse toutes les cellules qu'il touche, et que nous devons craindre et repousser? Voilà évidemment une grosse question, qu'on pourrait croire étudiée et, sinon résolue, poussée au moins au même degré que pour les substances notoirement alimentaires. Quand on cherche dans cette direction, on s'aperçoit que l'alcool a été totalement négligé. On ne sait ce qu'il vaut comme aliment. Il est vrai, qu'il y a, avec lui, des difficultés plus grandes qu'avec les autres. Il est volatil, et une partie de celui qui est ingéré s'en va par évaporation [1]. De plus, ces expériences sur la valeur alimentaire se font surtout sur les animaux, dont aucun précisément ne boit de l'alcool. Bref, cette étude a été délaissée, et la solution, si importante qu'elle soit, est restée dans le domaine des solutions instinctives, celles qui se paient le plus facilement de mauvaises raisons.

En ce moment, par exemple, l'alcool, si longtemps prôné, n'a pas pour lui l'opinion publique : c'est un poison, qui n'a de place que dans les pharmacies, tel est le cri général. Les physiologistes lui sont, en général, indifférents ou hostiles. Les microbiologistes ont aussi tendance à le condamner, en se disant que, dans toutes les fermentations où ils le rencontrent, dans la fermentation alcoolique surtout, l'alcool a un caractère de produit résiduaire, de *caput mortuum*, qu'il a fallu toute la malice de l'homme pour apprendre à aimer. Tout cela a contribué à donner à l'alcool une place à part, peu enviable.

Heureusement, un procès de revision a commencé, il y a quatre ou cinq ans. Au lieu de conclure contre l'alcool de ce qu'on le rencontre si souvent comme produit et résidu d'action microbienne, on commence à voir qu'il s'en forme partout, qu'il s'en consomme partout, et que n'en laissent que ceux qui en fabriquent plus qu'ils n'en

1. Cette part est beaucoup plus faible qu'on ne le supposait. Elle ne dépasse pas 2 à 2,5 0/0 d'après M. Atwater.

peuvent consommer. Voilà pour les microbiologistes. Quant aux physiologistes, un mémoire tout récent, inséré en 1902 dans les *Mémoires de l'Académie nationale des sciences des États-Unis*, permet de dire aujourd'hui que non seulement l'alcool n'est pas un poison, mais qu'il doit être placé à côté de l'amidon et du sucre, qu'il dépasse même par sa valeur alimentaire, car, à poids égal, il contient plus d'énergie. C'est un changement complet de point de vue au sujet de l'homme, et, pour les animaux, le moment approche où l'alcool entrera dans tous les tableaux de rations alimentaires.

Le travail, qui a ainsi changé nos idées, est le fruit d'une collaboration curieuse. A l'origine, nous trouvons un *Comité de 50 personnes pour les recherches sur les boissons*, créé par la *Wesleyan University;* en cours de route, ce comité a rencontré une Commission qui avait un objet similaire, celui de l'étude alimentaire des animaux, et qui avait été nommée par le ministre de l'Agriculture.

La question de l'alcool préoccupait tout le monde, parce qu'elle n'est pas exclusivement scientifique. Elle a son côté moral, elle a son côté économique. On ne savait pas ce qu'elle donnerait, mais on voulait la traiter à fond. L'accord entre toutes ces bonnes volontés tendant dans le même sens fut vite conclu. La *Wesleyan University* et le *Comité de cinquante*, qui étaient arrivés les premiers et avaient un laboratoire, conservèrent la direction. Pour l'argent, on réunit ses ressources, que vinrent augmenter de grosses souscriptions. Bref, le problème fut attaqué comme un gros problème, exigeant de grandes dépenses et un nombreux personnel. Les choses ont bien marché depuis. Les premières publications ont été des communications faites par MM. Atwater et Benedict en 1897, les signataires du dernier mémoire qui clôt pour le moment la question. Tout semble avoir été harmonieux et heureux dans l'affaire.

* * *

Ce déploiement de forces s'explique : c'est la première fois qu'on a tenu compte, pour les mesures, de tout ce que peut donner et de ce que donne l'aliment comburé physiologiquement dans l'organisme, la matière vivante, la chaleur, le mouvement, la force en travail et en réserve. Tout cela est alimentaire. Nous avons pris la mauvaise habitude d'y voir des effets différents, sous prétexte que nous les mesurons par des moyens différents. Mais l'expérience nous a toujours répondu en nous remettant dans le droit chemin. Nous avons cru pendant longtemps que la définition de l'aliment pouvait être donnée par la chimie, et que, par exemple, la gélatine était alimentaire parce qu'elle contient du carbone, de l'oxygène, de l'hydrogène et de l'azote comme le muscle, et dans des proportions à peu près les mêmes. Il a fallu en rabattre. La chimie se borne pour le

moment à établir le bilan de l'opération. Sachant le poids de l'aliment et sa composition élémentaire, elle cherche seulement comment se sont partagés, après l'opération faite, son carbone, son hydrogène, son oxygène et son azote, ce qu'on peut en retrouver dans les fèces, l'urine, la sueur, et ce qui semble avoir disparu sous forme de produits de la respiration et de la transpiration cutanée.

Ce classement de quantité est à peine un classement de qualité. Le meilleur aliment est évidemment celui dont le passage se traduira par une respiration et une combustion intimes plus actives. Dans le détail, ou est moins assuré, et il reste beaucoup de doutes. On n'a par exemple, aucun droit de ne voir dans le canal intestinal que des matières inassimilables, qu'aucun animal n'aurait pu digérer. Le même animal, le lendemain, aurait pu suffire à la besogne, car rien n'est contingent, surtout en présence des microbes, comme un acte digestif. Mais, si peu probants qu'ils soient, ces nombres sont nécessaires à connaître, et c'est à les recueillir que sont destinés ces appareils complexes dont les plus connus sont ceux de Regnault et Reiset, de Voit et Pettenkofer, de Nowak et Segen, etc., et dans lesquels on aspire dans des masques ou des chambres de respiration les produits gazeux fournis par l'aliment sous l'influence de la vie.

Toutes ces peines prises, nous connaissons les matières premières entrées dans l'usine, et ce qui en sort par les égouts ou la cheminée. Ce qui serait plus important, c'est de savoir ce qui se passe dans l'usine. Elle est en activité : partout il y a des mouvements, des frottements. Il serait curieux de savoir ce qui se dépense de l'aliment dans cette transformation en *actes de volonté consciente ou inconsciente*. Il faut de la chaleur pour toutes ces petites machines fonctionnant dans la grande. Il en faut en outre pour chauffer la grande, pour maintenir partout la température des tissus, au niveau requis pour leur fonctionnement régulier.

Ce sont les aliments qui sont chargés de cette dépense. Ils sont des sources de force, et on peut mesurer ce qu'ils en contiennent en les brûlant dans une bombe calorimétrique, On peut même, sur ce total connu à l'avance, faire le même décompte que sur les éléments chimiques, mesurer ce qui est allé à la chaleur animale, et à la force dépensée en travail. Au fond, ce n'est pas un phénomène nouveau qui s'ajoute ainsi au phénomène chimique ; c'est une forme nouvelle du phénomène général, et nous pourrions, si nous voulions, calculer la chaleur disponible en partant de la connaissance complète des aliments. Mais on a préféré d'ordinaire en faire quelque chose à part, qu'on évalue en calories, et le physicien qui la mesure est, d'ordinaire aussi, tout autre que celui qui fait les études de chimie dont nous avons parlé plus haut.

Cela posé, l'original et le nouveau des expériences américaines,

c'est que tout s'y mesure à la fois, que l'aliment est étudié au point de vue chimique et au point de vue calorimétrique. Il y a autre chose de curieux : l'être soumis à l'expérience est un savant qui y prend part. Au lieu de la surveillance, continue et inquiète, qu'exigerait un animal inerte, l'opérateur se surveille lui-même en même temps que les aides répandus autour de lui, car, naturellement, un homme dans ces conditions est en cage, mais dans une cage dont le modèle est tout à fait inédit.

***

Le problème que la Commission a résolu est en effet celui-ci : un homme en bonne santé, adulte, en équilibre, c'est-à-dire tel que son poids n'augmente et ne diminue pas, est, à un moment donné, introduit dans un espace limité qu'on peut comparer au réservoir d'un thermomètre, c'est-à-dire que toute variation thermométrique y devient sensible et mesurable. Il emporte avec lui, dans son asile, la dose d'aliments nécessaire à sa vie de plusieurs jours, car, comme il y a toujours un moment de perturbation au moment de la transition, il est meilleur que cette perturbation porte sur une expérience plus longue. Comme la chambre est close, un courant d'air la ventile constamment, apportant l'oxygène utile, enlevant les produits usés, analysé, cela va sans dire, à l'entrée et à la sortie, tant en quantité qu'en qualité. L'opérateur prend lui-même l'état de son pouls, de sa température, inscrit les états hygrométriques, exécute les divers articles de son programme nutritif affiché sur la chambre, extérieurement et intérieurement, et reste en communication téléphonique constante avec ses aides[1]. Sa chambre est d'ailleurs assez confortablement meublée : un lit, une table, une chaise pliante. S'il veut essayer, ce qui vient si naturellement à l'esprit, de voir l'effet du travail intérieur sur la nutrition, il y a un motocycle, dans lequel la force qu'il verse prend, au moyen d'une dynamo, la forme d'un courant électrique, ce cou-

1. Voici un de ces programmes. C'est celui d'un régime à l'alcool, avec travail, celui de la seconde expérience du groupe D, qu'on trouvera plus loin.

7 h. matin. Lever, uriner, collecter les condensateurs, peser les absorbants, se peser soi-même nu et habillé.

7 h. 45 Déjeuner, boire 200 gr. d'eau.

8 h. 20. Commencer le travail.

10 h. 20. Repos de 10 m., boire de l'alcool, boire aussi 200 gr. d'eau.

10 h. 30. Recommencer le travail.

12 h. 30. Arrêter. Boire 200 gr. d'eau.

1 h. Uriner, collecter les condensations, peser les absorbants.

1 h. 15. Dîner.

1 h. 50. Commencer le travail.

3 h. 50. Arrêter, repos de 10 m., boire l'alcool, boire aussi 200 gr. d'eau.

4 h. Commencer le travail.

6 h. Arrêter le travail.

6 h. 30. Souper, changer les vêtements de dessous, se peser nu et habillé.

7 h. Uriner, récolter les condensations, peser les absorbeurs.

10 h. Couvrir d'une couverture les provisions de bouche, boire 200 gr. d'eau, coucher.

1 h. Uriner.

Les mesures relatives au pouls, à la température, à l'état hygrométrique se faisaient *ad libitum*.

rant va se dépenser dans une lampe Edison, enfermée comme tout le reste dans la chambre, où sa chaleur va retrouver la chaleur versée par les autres formes de transformation de l'aliment. De la sorte, venues ensemble par l'aliment, toutes ces formes repartent sous la même forme, celle de chaleur, et sont récoltées par le même appareil.

Cet appareil est fait d'une série de tubes étroits en cuivre circulant dans la chambre, et récoltant dans l'air tout ce qui s'y trouve de chaleur excédant la sienne. Toute la chaleur produite vient donc se totaliser dans l'eau écoulée. Il suffit de la faire passer par un compteur et sur un thermomètre. Je n'entre pas dans plus de détails relatifs à l'évacuation des produits de la digestion. L'opérateur peut, lorsqu'il le veut, recueillir à part, à l'aide de tubes à eau froide, les produits de la respiration, ou dans des linges la sueur quand il a travaillé, peser par différence les produits obtenus et les étudier à part. Bref, il y a un opérateur de plus, et intelligent, dans la petite cage.

Ceux qu'intéresserait cet instrument, qui me semble devoir rester dans la physiologie, en trouveront la description et le fonctionnement dans les premières publications de M. Atwater signalées dans la Bibliographie. Malgré la simplicité de sa construction et de sa marche, il suffit à tant de choses qu'on peut être tenté de se demander s'il fait bien tout ce qu'il fait. Les deux expériences suivantes répondront à ce scrupule.

Il est à la fois un calorimètre et chambre de respiration. Nous pouvons l'étudier comme calorimètre en y envoyant de l'extérieur un courant d'électricité, qui s'y dépense par l'intermédiaire du motocycle, de la dynamo et de la lampe électrique, qui tous sont enfermés dans la chambre, et donnent de la chaleur que le courant d'eau emporte. Cinq expériences, faites par ce moyen, ont montré qu'en moyenne, le récepteur retrouvait 100,01 de la chaleur apportée par le courant électrique. On voit donc que l'appareil est bien protégé contre l'influence du rayonnement, ce à quoi aide naturellement beaucoup la constance de sa température.

Pour faire de même fonctionner l'appareil comme chambre de respiration artificielle, on y a brûlé un certain poids d'alcool bien pur, qui donnait à la fois de la chaleur, de l'eau et de l'acide carbonique.

Le tableau suivant indique ce que devait donner l'alcool qu'on a brûlé, et ce qu'on a trouvé en réalité :

	CO^2	H^2O	Calories.
	—	—	—
Valeur théorique........	19,240	12,264	64,554
Valeur trouvée...........	19,207	12,378	64,510
Proportion..............	99,8	100,9	99,9

L'appareil récolte donc très bien à la fois les matériaux chimiques et la chaleur. Il se révèle donc comme un instrument de premier ordre, auquel sont promis des résultats du plus grand intérêt.

*
* *

Maintenant que nous avons une méthode de travail et de bons instruments, revenons à notre question : quelle est la valeur alimentaire de l'alcool? Nous trouvons de suite une difficulté à résoudre, dont la solution va nous faire faire un pas considérable. Ce que nous voyons bien jusqu'ici, c'est que nous pouvons, après avoir introduit dans notre appareil un homme dans les conditions voulues, c'est-à-dire dans lequel *rien ne reste,* savoir ce que donne chez lui son régime d'entretien : respiration, excrétions, chaleur animale ou transformée en travail. Mais son aliment, qui le tient en bonne santé, doit être physiologique. Une boisson purement alcoolique ne peut pas être un aliment complet, et se substituer, même pendant une demi journée, à un aliment tel que du pain ou de la viande, qui, outre le carbone l'hydrogène et l'oxygéne, contiennent de l'azote. En le jugeant par la valeur alimentaire qu'il possède lorsqu'il est seul, on lui ferait tort, et on sortirait en outre du domaine de l'hygiène. En réfléchissant d'ailleurs un moment, nous voyons que nos meilleurs aliments ressemblent en cela à l'alcool. Tous deviennent dangereux au delà d'une certaine dose. On ne fait vraiment de la physiologie que si la nourriture est variée, si on vit de régime.

Mais l'opérateur peut toujours à l'avance, par un tâtonnement en général assez court, se faire deux menus, assez complexes pour satisfaire ses goûts, et qui diffèrent seulement en ceci que dans le second, l'un des aliments est remplacé par l'aliment qu'on veut étudier. Avec ce que nous savons sur les aliments, ce qu'il y a de mieux consiste, au moins pour commencer, à faire ce remplacement entre deux aliments très voisins, et à poids isodynamiques. Dans les expériences sur l'alcool, ce sont les aliments sucrés ou farineux qu'on a remplacés par de l'alcool. De plus l'alcool donnant à poids égal plus de chaleur que l'amidon ou la matière grasse, on en mettait moins. Ainsi, dans un cas, je vois qu'on a remplacé par 79,5 grammes d'alcool, ayant en tout 512 calories pour chaleur de combustion, 37 grammes de corps gras et 45 grammes d'hydrates de carbone représentant 520 calories. Une fois maître de ces deux régimes, assuré qu'ils peuvent se substituer l'un à l'autre sans trouble pour l'hygiène, on peut revenir à la marche signalée tout à l'heure, on peut commencer une expérience. Il n'est pas douteux que les résultats de la comparaison seront attribuables à l'alcool. Trois opérateurs, un Suédois, un Américain, un Canadien, tous assistants du Laboratoire, ont fait les 26 expériences que nous allons résumer. Chose à signaler, deux d'entre eux étaient des abstinents de l'alcool, et en ont bu sans difficulté dans ces essais. La dose en était faible et équivalait tout au plus à un litre de vin léger par jour;

elle n'a produit aucun effet particulier bien sensible; nous sommes toujours dans des conditions physiologiques.

Voici une partie du tableau récapitulatif des expériences, avec leurs dates. On les a divisées en groupes qui sont très comparables. Dans chacun de ces groupes, le régime était le même, et les deux parties ont été souvent le calque l'une de l'autre, car l'expérience avec l'alcool faisait sandwich avec elles, sans que l'opérateur quittât la chambre.

GROUPES	DATES	DURÉE	NATURE de l'expérience. Repos.	NATURE de l'expérience. Régime.	Albuminoïde de l'aliment.	Énergie de l'aliment.
					Gr.	Cal.
A	Janvier 10-14 1898.	4 jours.	Repos.	Ordinaire.	119	2,717
	Février 15-19 1898.	4 —	—	Alcool.	123	2,109
B	Mars 19-22 1899.	3 —	—	Ordinaire.	124	3,061
	— 13-16 1899.	3 —	—	Alcool.	124	3,044
C	Février 14-17 1900.	3 —	—	Ordinaire.	100	2,490
	— 17-20 1900.	3 —	—	Alcool.	99	2,491
	— 20-23 1900.	3 —	—	Ordinaire.	99	2,489
D	Mars 22-26 1898.	4 —	Travail.	Ordinaire.	124	3,862
	Avril 12-16 1898.	4 —	—	Alcool.	121	3,891
E	Mars 16-19 1900.	3 —	—	Ordinaire.	100	3,487
	— 19-22 1900.	3 —	—	Alcool.	99	3,458
	— 23-25 1900.	3 —	—	Ordinaire.	100	3,495
F	Avril 20-23 1900.	3 —	—	Ordinaire.	101	3,487
	— 23-26 1900.	3 —	—	Alcool.	100	3,486
	— 26-29 1900.	3 —	—	Ordinaire.	100	3,493

L'alcool a été étudié, comme on voit, pendant l'état de repos, c'est-à-dire de vie aussi inerte que possible du sujet, et cette même vie dans laquelle entraient huit heures par jour de travail au vélocipède. Bien entendu, il fallait ici un entraînement spécial : le régime était plus généreux. La dose d'alcool n'était pas changée, cependant. Seulement, l'alcool qui, dans les cas de repos, représentait 1/5 de la dose d'aliments, en représentait 1/6 ou 1/7.

Enfin, il faut savoir aussi que les chiffres de la dernière colonne sont les nombres de calories fournis par les matériaux du régime journalier dont la pratique avait révélé l'équivalence. C'est celle qu'il faut surtout envisager. Elle nous dit ceci : *Dans le régime alimentaire de trois hommes valides, on a pu, sans inconvénient, remplacer du beurre, des légumes ou autres aliments analogues par de l'alcool sous forme de vin ou d'eau-de-vie. Ces remplacements et ces alternances ne dépendent pas de l'état de repos ou de travail, ni d'aucune circonstance relative au consommateur. Tout est commandé par le coefficient isodynamique de l'aliment, qui reste physiologiquement le même, si la substitution se fait en tenant compte de ces coefficients, et quand on supprime le vin dans un repas, il faut le remplacer par quelque chose.* Voilà ce que nous dit le tableau. En réalité, et contrairement aux apparences, l'expérience se faisait en dehors de l'appareil, elle con-

sistait à trouver par tâtonnement un régime dans lequel on pouvait changer sans inconvénient un élément par de l'alcool. C'est un point sur lequel les auteurs du mémoire, perdus dans le dédale des faits expérimentaux, n'insistent peut être pas assez. L'instrument n'est intervenu avec sa perfection qu'au moment où il a fallu mesurer, et où on vit ressortir l'équivalence.

* * *

Voilà donc le changement de point de vue que je signalais en commençant; je ne dis pas le changement de doctrine, il n'y avait pas de doctrine. La science n'avait pas étudié cette question, elle s'y heurtait de divers côtés, et quand on réfléchissait au sujet de cet obstacle rencontré dans son chemin, on se disait que c'était vraiment fâcheux de le trouver toujours là, car la science se faisait autour de lui, et il commençait à gêner de belles perspectives. L'obstacle est tombé, et on a vu qu'il ne cachait rien d'imprévu. L'alcool était à sa place comme aliment, ainsi qu'on pouvait le deviner par ce qu'on savait de lui en microbiologie.

Mais cela, il fallait le dire, et c'est le mérite de M. Atwater et de ses collaborateurs de l'avoir dit. Ils nous ont montré que l'alcool ne changeait pas les qualités physiologiquement alibiles d'une ration normale, celle qui maintient les forces pendant l'état de santé. Il est donc un aliment au même titre que les aliments variés qu'il remplace. De plus, la substitution utile doit se faire non pas poids pour poids, mais par parties dégageant, quand on les brûle, la même quantité de chaleur, et contenant la même quantité d'énergie. Sous ce point de vue, l'alcool est aux premiers rangs de la liste.

Nous devons donc lui faire nos excuses pour la façon dont nous l'avons traité jusqu'ici. — L'ivresse qu'il donne? Je sais bien, c'est le côté fâcheux. Un aliment placé à un aussi bon rang, et qui arrive si facilement dans les tissus, a les inconvénients de ses avantages. Usez : n'abusez pas. Surtout, ne raisonnez pas à la façon d'un *skopzoï*. Quant aux conséquences fiscales qui résultent pour l'alcool de sa mauvaise réputation, elles sont aussi à changer depuis que l'alcool est devenu quelqu'un. Mais nous sommes là sur un terrain qui n'est plus celui de ce journal. Et puis, il faut laisser les esprits s'habituer à la lumière et à la vérité.

E. Duclaux.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

16me ANNÉE 25 DÉCEMBRE 1902 N° 12

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA PUTRÉFACTION
DE LA VIANDE DE BOUCHERIE

PAR MM.

HENRY TISSIER ET MARTELLY

Ancien interne des Hôpitaux — Interne en pharmacie à l'Asile Ste Anne.

Depuis longtemps, le phénomène de la putréfaction ou décomposition d'origine microbienne de la molécule albuminoïde attire l'attention des chercheurs. Les travaux qui s'y rattachent sont nombreux, et quoique nous ne puissions ici faire l'historique complet de cette importante question, nous devons tout au moins citer les principaux auteurs. C'est Pasteur qui le premier, en 1877, en étudiant le vibron septique, put démontrer l'existence d'une bactérie douée d'un pouvoir protéolytique. Il prouva l'existence de la vie anaérobie, et établit le rôle primordial des espèces vivant à l'abri de l'air dans la putréfaction. Les travaux de Kerry, Nencki, Bovet ne firent que confirmer ces premières recherches.

Mais après les études de Hauser, Kühne, Foa et Bonome, Tito-Carbone, Gaillard, Lannelongue et Achard sur le *Proteus*, on admit que les aérobies devaient également jouer un rôle. Malvoz en 1899 trouva toujours chez le cadavre le *B. coli* et il lui attribua une action primordiale. Peu à peu on oublia les anaérobies, et Macé, en décrivant les phases de la putréfaction, les passa sous silence. « Tout d'abord, écrivait cet auteur dans son traité de bactériologie, apparaissent le *B. subtilis*, le *B. mesentericus*, le *B. termo*, on ne perçoit qu'une odeur plutôt fade, ce n'est pas encore la putréfaction. Un ou deux jours après, ces espèces ont cédé le pas à d'autres où dominent le *B. fluorescens liquefaciens*, le *B. fluorescens putidus*, le *B. violaceus* : c'est une seconde phase du phénomène. Quelques jours après, l'odeur

est nettement putride; c'est alors, troisième phase, qu'apparaissent les *Proteus vulgaris* et *mirabilis* qui dominent bientôt et deviennent envahissants. »

Cependant Veillon et Zuber en 1898, puis Hallé, Rist, Guillemot, Cottet, dans une série de remarquables travaux, démontraient que dans tous les pus à odeur putride il existait constamment et souvent même uniquement des anaérobies. Il était donc probable que dans l'attaque de la matière albuminoïde morte, il devait également s'en trouver. C'est ce que démontra à nouveau Bienstock en 1900, dans ses intéressantes recherches sur le *B. putrificus coli*. En 1884 cet auteur avait trouvé cette espèce dans l'intestin de l'homme, mais il la considérait comme un aérobie; il avait vu depuis qu'il s'agissait d'un anaérobie et il en donnait une description fort exacte. Dans un travail ultérieur, il avouait ne plus pouvoir l'obtenir dans les matières fécales. Mais un des points les plus curieux de son mémoire était la démonstration d'une action d'arrêt. produite par les *B. coli* et *B. lactis aerogenes* sur cette bactérie de la putréfaction, action surtout évidente dans le lait ou dans des milieux contenant des hydrates de carbone. Il l'attribuait à une sorte de *force antagoniste* des deux bactéries, hôtes habituels de l'intestin, qui empêchaient ainsi la putréfaction intestinale.

Ce travail de Bienstock présentait pour nous un grand intérêt. Tout d'abord. il donnait une description complète d'une espèce anaérobie protéolytique semblable à celle que l'un de nous venait d'isoler du méconium. Nous devions donc chercher le *B. putrificus* dans la putréfaction pour voir si ses caractères étaient identiques. En outre. l'action d'arrêt causée par la force antagoniste du *B. coli* et du *B. lactis* sur ce protéolytique, rappelait l'action empêchante des bactéries de la flore normale de l'intestin du nourrisson vis-à-vis de certaines espèces anormales[1]. Il nous fallait donc étudier à nouveau ces faits, ces deux actions empêchantes pouvant avoir la même cause.

C'est ainsi que nous avons été tout d'abord amenés à isoler le *B. putrificus* des viandes altérées, puis à chercher les autres espèces qui y vivent en symbiose, pour élucider leur action respective.

Ces recherches ont donc été. nécessairement, très longues et

1. H. Tissier, *Recherches sur la Flore intestinale du nourrisson.* Paris 1900.

très minutieuses. Elles sont encore forcément incomplètes. Les données chimiques, que nous possédons sur la matière albuminoïde, sont encore rudimentaires et il ne nous était guère possible de préciser, d'une façon plus exacte, l'action chimique des diverses espèces protéolytiques que nous étions parvenus à isoler, de faire en un mot, pour ces bactéries, ce que d'autres auteurs ont pu faire pour des fermentations plus simples, comme la fermentation lactique ou butyrique.

TECHNIQUE

Nous nous sommes bornés pour ces premières recherches à la viande de bœuf commerciale, prise dans une boucherie quelconque, et présentant toutes les garanties exigées pour la consommation courante. Pour éviter autant que possible l'influence du passage par le même abattoir ou la même boucherie, nous avons eu soin de prendre notre matériel d'observation à des boucheries différentes, et à le faire distribuer, dans les ballons d'expérience stérilisés, dans des laboratoires différents. Nous ne touchions en aucun cas à la viande prélevée, et, pour les ensemencements, nous ne nous servions que de pipettes flambées. Les manipulations et la mise en œuvre des échantillons se faisaient aussi dans des laboratoires différents. Toutes ces précautions n'étaient pas inutiles, puisque, comme nous nous y attendions, les résultats étaient concordants et les principales espèces les mêmes. Les ballons d'étude ont été mis dans une étuve à 20°. Pour étudier une putréfaction, comme elle se produit d'ordinaire, la viande fut mise sur une plaque de verre stérilisée recouverte d'une cloche. Pour faire cette même recherche, mais à l'abri des germes de l'air et des poussières, nous nous sommes servis de ballons stérilisés, bouchés avec de l'ouate également stérile. Pour faire cette même étude en milieu privé d'oxygène, la viande fut mise dans un grand ballon contenant de l'eau distillée stérilisée. Quand nous voulions connaître la marche, la date d'apparition, des espèces d'une putréfaction, on se servait d'une même viande répartie dans 10 ou 15 ballons. Tous les 2 à 3 jours ou tous les 8 jours, on examinait, au point de vue bactériologique et chimique, le contenu. Pour isoler les espèces, nous nous sommes servis de la méthode de Veillon qui nous permet d'obtenir facilement les aérobies, les facultatifs et

les anaérobies. Cette méthode commence à être connue et nous n'avons pas à la décrire ici. Ce qu'il est important de répéter, c'est qu'il est impossible, au moyen des autres méthodes employées dans les laboratoires, d'obtenir un résultat comparable. Nous avons été amenés, cependant, à y ajouter une légère complication.

Dans une putréfaction, en effet, surtout à son début, la quantité des espèces aérobies, ou facultatives, est telle qu'elle empêche l'apparition des anaérobies, soit en modifiant la réaction du milieu, soit en le disloquant. Pour obvier à cet inconvénient, nous nous sommes inspirés de la méthode employée par Rist dans son étude du *Leben* pour éliminer les aérobies stricts. Cet auteur, avant de faire ses ensemencements en tubes profonds, faisait des cultures en bouillon privé d'air. Il obtenait ainsi, après un certain nombre de passages, les espèces facultatives seules. Nous procédons d'une façon analogue. Avant de faire nos répartitions, dans les tubes de gélose sucrée, en profondeur, nous faisons d'abord des cultures sur gélose couchée, afin d'obtenir les aérobies et les espèces facultatives, puis nous ensemençons un ou deux tubes de bouillon ordinaire, que l'on ferme à la lampe, après y avoir fait le vide. Ces tubes ne sont ouverts qu'au bout de 8 jours. Nous avons pu nous rendre compte ainsi, que si les facultatifs n'ont pas absolument disparu, leur vitalité et leur nombre diminuent; par contre, les anaérobies se multiplient et il est facile de les isoler d'après la méthode de Veillon. Si après ce temps, il existe encore trop de facultatifs, on peut faire une série de passages en bouillon privé d'air.

Cette modification nous a permis d'avoir d'excellents résultats.

Les espèces une fois isolées, nous étudions leurs caractères morphologiques, chimiques et biologiques.

(*A*) ÉTUDE DES CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Nous avons suivi, pour cette étude, les procédés en usage dans tous les laboratoires. — Examen microscopique, étude de la mobilité, réaction chromophile, forme des cultures, leurs caractères sur les milieux liquides, bouillons simples, peptonisés, sucrés, lait, gélatine, gélose couchée ou profonde, etc. Ce n'est que lorsque toutes les espèces étaient ainsi caractérisées que

nous cherchions leur action chimique sur les diverses substances.

(*B*) ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.

La viande est formée de subtances très diverses. Pour connaître le rôle d'une espèce dans le processus putride, il est donc nécessaire de l'ensemencer dans des milieux minéraux très simples, contenant ces diverses substances, de chercher son action chimique sur chacune d'elles, puis enfin de l'ensemencer sur une viande de constitution identique à celle qui nous avait servi au prélèvement.

Comme la partie la plus importante du muscle n'est pas connue à l'état pur, il est impossible d'opérer ainsi.

Voici les procédés que nous avons appliqués, pour connaître l'action d'une espèce isolée sur les substances ternaires (graisse, sucre, etc.), sur les substances protéiques naturelles hydratées ou leurs dérivés (protéoses et peptones, amines, créatine, urée, etc.) et enfin sur la viande de bœuf.

ACTION SUR LES HYDRATES DE CARBONE. — 1° *Sucres*. — Nous nous sommes servis de glucose, lactose, maltose et amidon, tantôt mis dans des milieux ne contenant que des sels ammoniacaux, tantôt dans des milieux plus complexes, avec de la fibrine, de la caséine, de la gélatine, etc., suivant les cas.

On procédait ensuite au dosage du sucre restant, des acides volatils, des acides fixes, ainsi qu'il est dit dans les ouvrages classiques. Les autres substances étaient examinées comme nous allons le voir.

2° *Graisses*. — En général la plupart de nos milieux étaient dépourvus de matières grasses, mais dans les cas où nous nous servions de viande de bœuf broyée, il était nécessaire de chercher s'il s'était produit une modification de ce côté. On recueillait donc soigneusement les graisses et on les dosait. Quand il s'était formé des savons ammoniacaux, ce qui se produit assez fréquemment, on traitait par l'alcool sodé, pour déplacer la base et on distillait. L'ammoniaque ainsi recueillie était dosée.

ACTION SUR LES SUBSTANCES PROTÉIQUES. — 1° *Albuminoïdes*. — Nous avons choisi la fibrine, dont la préparation est la plus facile. Cette fibrine soigneusement lavée est mise d'ordinaire soit dans du liquide de Cohn, ou mieux d'Utschinsky-Frankel légèrement

alcalin, comme l'a bien fait remarquer Bienstock. Pour avoir un milieu anaérobie on met environ 30 grammes de fibrine pour 250 grammes de ce liquide dans un ballon à long col, avec une couche d'huile de vaseline. Le tout est stérilisé à 120° ou mieux à 100° pendant trois jours. Le ballon ensemencé est ensuite mis à l'étuve à 37° pendant un temps variable, 15 jours à 1 mois au plus. On procède ensuite à l'analyse.

Au début de nos recherches, nous avons tenu à suivre exactement toutes les méthodes de Bienstock, dont les analyses chimiques, faites par Wallach, sont décrites dans ces *Annales* [1]. Le procédé consiste dans ses grandes lignes à traiter le liquide de la façon suivante : après distillation et clarification, on filtre, puis on traite par l'éther qui dissout les phénols, l'indol, le scatol et les bases. Le résidu est concentré en présence de $NaCO^3$, puis repris par l'alcool, qui dissout les acides butyrique, valérianique, la leucine. etc. Ce résidu contient en outre l'acide paraoxyphénylpropionique.

Cetre méthode n'est pas à l'abri de tout reproche. En effet, pour la recherche des acides volatils, on ne les caractérise que par leur odeur ; il nous semble qu'il est préférable d'opérer suivant la méthode de Duclaux. Pour la recherche des amines, nous avons remplacé l'éther sodé par une solution alcoolique sodée de chloroforme (réaction d'Hoffmann). Pour les phénols, leur dosage, leur séparation avec l'indol et le scatol, nous avons suivi le procédé ordinaire.

Voici, en résumé, comment nous procédons : on ajoute à la culture entière 100 c.c. d'eau distillée froide et on laisse en contact 24 heures à la glacière, on pèse et on filtre.

A) Le filtral obtenu est divisé en cinq parties :

1° La première sert à l'examen des gaz, à la recherche d'H^2S. On ajoute de l'acide chlorhydrique et on distille. Le produit est recueilli dans un liquide contenant de l'acétate de plomb qui se colore en brun du fait de ce gaz. On contrôle par la réaction au nitroprussiate de soude en faisant une nouvelle distillation dans un liquide contenant 1 0/0 de ce corps;

2° La deuxième portion sert à doser les acides volatils, par le procédé de Duclaux; les acides fixes restant dans la cornue sont caractérisés par les méthodes appropriées ;

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 25 nov. 1899, n° 11, p. 860.

3° Cette partie du filtrat sert à doser les bases volatiles. On additionne de magnésie et on distille. Le produit est recueilli dans des vases fermés. Les amines y sont caractérisées par la réaction d'Hoffmann, l'ammoniaque par ses réactions d'identité. On fait ensuite un dosage alcalimétrique et le tout est évalué en AzH^3. Il ne faut pas oublier que le milieu de Frankel est ammoniacal; on déduira de la quantité obtenue, l'ammoniaque du milieu qui est connue;

4° La quatrième portion du filtrat primitif sert à doser les corps entraînés par la vapeur d'eau, l'indol, le scatol et les phénols. On acidule avec l'acide acétique, on distille jusqu'à ce que le liquide ne précipite plus avec l'eau de Brome. On neutralise avec de la soude et on ajoute de l'éther. La solution éthérée décantée est abandonnée à l'évaporation. Le résidu huileux se prend en une masse cristalline. On dissout à l'eau bouillante, on filtre et on obtient les cristaux de scatol. Le liquide séparé de ces cristaux abandonne ensuite l'indol par évaporation. La liqueur, débarrassée de ces deux corps, contient encore les phénols, on les précipite par la potasse et on distille. Les phénates restés dans la cornue sont mis en liberté par HCl, on distille à nouveau, et le produit traité par l'eau de Brome laisse déposer le tribromophénol que l'on pèse [1];

5° On étudie alors les produits fixes. Denaeyer [2] a montré que si l'on traitait un produit de digestion par l'alcool à 95° en excès, on obtient un précipité (albumines, protéoses, peptones), l'alcool dissout les principes extractifs (carnine, créatine, créatinine), les produits de décomposition des protéoses (leucine, tyrosine, acide aspartique) et des gélatoses (alanine, glycocolle, acide amido-butyrique). Cette réaction nous sera d'une grande utilité, car le rapport entre le précipité formé surtout de protéoses et les substances solubles (poids d'extractif) nous renseignera sur l'intensité de la destruction de la matière albuminoïde.

On additionne donc cette partie du filtrat de carbonate de soude et on évapore au bain-marie, on traite par l'alcool en excès et on laisse déposer pendant 24 heures. On décante la solution alcoolique, on évapore et on pèse [3].

1. Duclaux, *Chimie biologique*, p. 758.
2. Dupuy, *Cours de pharmacie*, t. II, p. 631.
3. Il faudra déduire de ce poids d'extractif le poids des sels minéraux et d'asparagine contenu dans le liquide de Frankel.

La leucine et la tyrosine seront facilement décelées au microscope.

Le précipité est repris par l'eau qui dissout les protéoses et les albuminoïdes solubles. On porte à l'ébullition, puis on filtre, on a le poids de ce dernier corps. Les protéoses en solution sont évaporées, séchées et pesées, Pour en séparer les peptones, on précipite par le sulfate d'ammoniaque et on dialyse.

B) Le résidu solide de la culture filtrée est séché et épuisé pendant 12 heures par l'éther bouillant pour obtenir les graisses.

On traite ensuite ce résidu par l'eau distillée bouillante, la liqueur obtenue est filtrée, évaporée. Ce dernier produit séché et pesé est considéré comme de la gélatine.

On sait que d'après les recherches de Selmi, de Gautier, qu'il existe dans la putréfaction, des bases toxiques, ayant les caractères des alcaloïdes, ce sont les *ptomaïnes*.

Il faudra dont chercher quelles seront les bactéries susceptibles d'en produire dans les cultures. Nous nous sommes servis pour caractériser ces corps des procédés décrits par les auteurs et modifiés par Ogier.

Nous verrons dans le cours de ce travail que les microbes qui digèrent la fibrine sont nombreux ; nous avons cherché pour chacun d'eux leur *diastase*, pour les comparer entre elles.

Pour cette recherche, nous avons, de prime abord, rejeté toutes les méthodes basées exclusivement sur l'action de l'alcool, qui donnent en général un mauvais rendement. Nous nous sommes servis du procédé de Cohnheim et de Wroblesky. La culture filtrée, acidulée par l'acide phosphorique, est traitée par le sucrate de chaux. Le précipité entraîne la diastase qui est reprise par l'eau. On met ce liquide à l'étuve à 50° avec un cristal de thymol. C'est un procédé couramment employé. Dans certains cas il semble qu'il y ait adhérence de la diastase aux corps microbien. Il faut alors ajouter une substance facilitant l'osmose comme la glycérine. On peut alors se rendre compte que le rendement en diastase est bien supérieur.

Nous avons pensé qu'il était nécessaire de faire des recherches avec une substance analogue, la caséine du lait.

Nous avons d'abord pris du lait de vache, ordinaire, stérilisé à 120°. Pour le dosage du lactose, des acides fixes, des acides volatiles, nous n'avons rien fait d'autre que ce qui a été dit pré-

cédemment. Les matières protéiques sont analysées comme nous l'avons vu, après séparation de la caséine par l'acide acétique. Mais le lait est une substance complexe ; nous avons cherché un autre milieu ne contenant surtout que de la caséine. Le *plasmon* nous a paru remplir ces conditions. On sait en effet qu'il contient 77 0/0 de caséine, 1,3 seulement de corps gras, 2,8 de lactose et 6,2 desels minéraux. De plus, il se dissout facilement dans l'eau et sa réaction est alcaline. C'est donc un milieu de choix.

Action sur les dérivés des substances protéiques. — 1° *Peptones*. — On peut prendre comme milieux d'expérience des liquides simples, contenant des peptones commerciales qui, comme on le sait, sont des mélanges complexes. Si elles sont alcalines, il faudra toujours avoir soin d'en faire l'analyse et d'en doser l'ammoniaque dans des tubes témoins, préparés en même temps, et avec la même peptone.

2° *Créatine*. — Ce corps existe dans la viande fraîche, il faudra donc faire des milieux contenant cette substance. Nous nous sommes servis de créatine pure commerciale.

3° *Urée, Acide urique*. — Nous avons d'abord pris de l'urine d'un adulte normal, stérilisée, qui était ensuite ensemencée, mise à l'étuve et analysée. Il ne faut pas oublier, ainsi que l'a indiqué Miquel, que du fait de la stérilisation, une partie de l'urée se transforme en carbonate d'ammoniaque. Il faut toujours avoir un tube témoin dans lequel on dose l'azote avant et après l'ébullition on sait de cette façon la quantité véritable d'urée que contient l'urine en expérience. Lorsque l'attaque de cette substance est faible, il est préférable de faire un dosage alcalimétrique dans le tube témoin et dans le tube ensemencé.

Nous avons employé également l'urée commerciale, mais c'est un produit très impur. Nous avons eu soin de chercher toujours, avant de nous en servir, la quantité exacte d'urée qu'elle pouvait contenir.

Tels sont, en résumé, les procédés de dosage que nous avons employés. Ils sont évidemment imparfaits, mais on ne connaît pas assez la constitution de la molécule albuminoïde, pour avoir des résultats plus précis. La plupart sont approximatifs, mais ils suffisent pour nous renseigner sur les grandes lignes et sur la marche générale de la putréfaction.

DESCRIPTION DES MICROORGANISMES

AÉROBIES FACULTATIFS.

Les espèces que nous avons isolées sont au nombre de 13. La plupart sont connues et nous nous bornerons à préciser leur action chimique. Quelques-unes ne nous semblent pas avoir été décrites; nous en donnerons une description plus complète.

Micrococcus flavus liquefaciens (Flugge). — C'est une espèce fréquente dans les poussières de l'air. Dans les putréfactions elle est assez rare, elle apparaît surtout au début et disparaît par la suite au bout de 8 à 15 jours.

Ses caractères morphologiques sont connus : nous n'avons pas à les décrire.

Elle possède les propriétés chimiques suivantes : c'est un ferment actif des divers sucres, glucose, lactose, etc... aux dépens desquels elle produit des acides gras et en particulier de l'acide lactique. Le lait est en effet rapidement coagulé, les milieux glucosés sont acides au bout de 24 heures.

Son action sur les substances protéiques est peu considérable. Sur ces mêmes substances hydratées, elle donne du carbonate d'ammoniaque et de l'ammoniaque.

Son rôle dans les putréfactions a donc son importance. C'est, comme nous le verrons plus loin, un rôle préparatoire.

Diplococcus griseus non liquefaciens (espèce nouvelle). — Ce diplocoque est plus fréquent dans les viandes altérées. On peut le trouver, dans toutes les périodes de la putréfaction, au bout de 24 heures comme au bout de trois mois.

A l'examen direct, il se présente sous la forme d'un gros diplocoque isolé ou en amas, formant aussi de courtes chaînes de 4 à 5 éléments. Dans les milieux liquides, on trouve surtout des diplocoques; mais sur les milieux solides, il devient très polymorphe. Dans les cultures un peu vieilles, à côté de coccus réguliers, disposés par paires, il n'est pas rare de trouver des formes allongées, et même des bacilles à extrémités renflées formant des massues. On peut voir, par exemple, des chaînettes dont les grains médians sont arrondis et terminés par ces formes bacillaires.

Il se colore bien par les méthodes ordinaires et garde la coloration par la méthode de Gram. Les formes allongées ne pren-

nent la couleur que par places, comme des formes d'involution.

Il pousse à 22° comme à 37°. Il est tué par l'ébullition. Sa vitalité est assez considérable, on peut le réensemencer de cultures datant de plus de 3 semaines.

Sur gélose ordinaire à 37°, après 24 heures d'étuve, on voit de petits points gris blanchâtres qui s'accroissent lentement; 48 heures après, ces colonies deviennent plus nettes. Elles sont arrondies, régulières, à bords nets, d'une teinte gris bleu et transparentes. Le centre s'éclaircit, les bords deviennent plus épais. En vieillissant, elles deviennent granuleuses, piquetées de points blancs et les bords sont diffus. L'eau d'exsudation de la gélose est trouble, il s'y forme un dépôt pulvérulent. Sur le même milieu sucré, le développement est plus rapide, les colonies plus épaisses.

Inoculée en gélatine, en piqûre, cette espèce pousse dans les 24 heures, donnant des masses arrondies, fines, le long du canal d'inoculation. Le milieu n'est pas liquéfié. On n'obtient pas de culture apparente sur pomme de terre.

Dans la gélose sucrée profonde, le développement se fait dans toute la hauteur du tube, en formant des colonies lenticulaires régulières. Il ne se forme pas de gaz. Le bouillon ordinaire devient trouble au bout de 24 heures, il s'y forme peu à peu un dépôt blanchâtre pulvérulent. La culture est plus abondante en bouillon sucré. Le lait n'est pas coagulé, même après un mois d'étuve. L'urine ensemencée se trouble également assez rapidement, il s'y forme un dépôt. Les milieux contenant de la fibrine, de la viande se comportent comme le bouillon. On ne remarque aucune attaque apparente des albumines.

L'analyse chimique de ces divers milieux montre que ce diplocoque agit sur certains sucres comme le glucose, avec lequel il donne des acides gras, mais il ne dédouble pas le lactose. Cette action s'arrête quand l'acide atteint environ 1 0/00 en SO^4H^2.

Il ne possède aucune action sur les substances protéiques naturelles, il ne les modifie que lorsqu'elles ont subi une première hydratation. Ainsi il attaque fortement les protéoses en donnant de l'indol, du carbonate d'ammoniaque et de l'ammoniaque. Cette action ne se produit que dans des milieux à réaction alcaline neutre ou faiblement acide.

Dans les milieux mixtes, peptonisés et sucrés, les deux substances sont attaquées. La production d'acide est plus rapide que la production d'ammoniaque et la culture s'arrête quand la réaction atteint le chiffre indiqué. Tout dépend de la quantité de glucose primitive. La culture continuera et deviendra alcaline avec 10 grammes au plus de sucre p. 1000. On obtient le même résultat avec des doses supérieures en ajoutant du carbonate de chaux.

Ce diplocoque attaque aussi les dérivés ultimes des albuminoïdes. Il transforme l'urée en ammoniaque. De l'urine contenant $17^{gr},37$ d'urée n'en contient plus que $14^{gr},50$ au bout de 8 jours de culture. Dans un milieu mixte contenant à la fois urée et glucose, la fermentation des deux corps est aussi simultanée; la production d'ammoniaque est plus grande qu'avec la peptone et plus rapide.

Streptocoque pyogène. — Nous avons isolé également un streptocoque ayant tous les caractères morphologiques du pyogène ordinaire, mais de virulence faible, puisqu'il tue la souris en 8 jours à la dose de 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures.

Ses caractères chimiques rappellent ceux de cette espèce.

Les sucres, et particulièrement le glucose, sont rapidement attaqués, avec production d'acides gras et surtout d'acide lactique. L'acidité produite dépasse toujours celle produite par le *B. coli* dans des milieux identiques.

Aucune action sur les substances protéiques naturelles, mais en revanche, attaque rapide de ces mêmes substances peptonisées. Avec les protéoses, il produit de l'ammoniaque, mais jamais d'indol. Sur l'urée, il ne forme que de très petites quantités de carbonate d'ammoniaque.

Staphylocoque pyogène blanc. — Nous avons, par contre, trouvé une race de staphylocoque qui présente des particularités plus intéressantes.

Au point de vue morphologique, elle ne se différencie de la description classique que par des colonies plus fines, d'une coloration gris blanc. Le lait est coagulé d'une façon assez spéciale. Après 24 heures d'étuve, il se sépare en 3 couches. Une superficielle, crémeuse, est formée de gouttes huileuses,

une médiane transparente roussâtre et une couche profonde constituée de fins grumeaux de caséine. Il pousse sur pomme de terre et liquéfie la gélatine.

Au point de vue chimique, il attaque vivement les hexoses en donnant de l'acide lactique, des traces d'acide acétique et valérianique. Il agit aussi sur le lactose qu'il dédouble en donnant, surtout, de l'acide lactique. Les graisses sont émulsionnées et saponifiées dans les milieux contenant de la viande.

Il transforme les substances protéiques en secrétant une *diastase*. Si on ensemence en effet cette espèce sur un milieu contenant de la fibrine dans du liquide d'Utschinsky-Frankel, nous voyons le milieu se troubler, dégager une odeur désagréable, et la fibrine est désagrégée. A l'analyse, on voit qu'il s'est produit des traces d'indol et d'hydrogène sulfuré, des protéoses, des acides gras et aromatiques, acétique, butyrique, valérianique, des amines, de la leucine et de la tyrosine, mais pas de phénols. Cette transformation n'a pu se faire que sous l'influence d'une diastase. Pour l'isoler, on se sert du procédé de Conheim. Le liquide obtenu, mis à 50° en présence de fibrine stérilisée avec un cristal de thymol, transforme nettement la matière albuminoïde. En faisant varier la réaction du milieu, on voit que l'attaque, faible en présence d'une trace d'acide, devient nette quand la réaction est alcaline. C'est donc une *diastase trypsique*. Elle agit de même façon sur la caséine et la gélatine. Nous devons dire, cependant, qu'elle est moins énergique que la diastase de certains anaérobies, comme le *B. putrificus*, par exemple. La quantité de peptones produites dans le même temps est bien moindre.

Cherchons maintenant ce qui se produira quand ce staphylocoque, à la fois ferment du sucre et ferment de l'albumine, se trouvera en présence de ces deux substances. Ensemençons un milieu contenant de la fibrine et du sucre dans du liquide d'Utschinsky-Frankel. Tout se passe comme s'il y avait *sécrétion simultanée* de deux diastases. Mais la fermentation de l'hexose produira plus d'acide que l'autre ne produit de base. Peu à peu le milieu de neutre devient acide, jusqu'à ce que la réaction, atteignant un certain chiffre d'acidité, la culture s'arrête. Dans cette culture arrêtée on trouve, à côté de l'acide

lactique, acétique, de petites quantités d'indol, des amines, de la leucine, de la tyrosine, etc., indice certain de l'attaque de l'albumine. Reprenons le résidu de fibrine non transformé, traitons-le par l'éther, nous obtenons une couche aqueuse au dessous de la couche éthérée. Cette couche aqueuse contient de la diastase. Il suffira de la diluer, d'ajouter une petite quantité de soude, pour obtenir, avec une fibrine neuve, une nouvelle protéolysation.

Dans le lait, nous voyons qu'il se produit une action analogue. Après 15 jours d'étuve, le lactose, de 4^{gr},517 0/0, atteint 3,714 0/0. L'extrait sec de 11,2 0/0 est descendu à 9,5, les cendres de 0,80 à 0,65. La caséine est en partie peptonisée. On ne trouve pas d'indol ni d'H^2S, mais des caséoses, des acides butyrique, lactique, acétique.

Il attaque les protéoses en donnant des corps extractifs, de l'ammoniaque et des traces d'indol.

Tout ceci ne se produit qu'en milieu neutre, alcalin ou faiblement acide. Avec un mélange de sucre et de peptones, il se produit les mêmes faits qu'avec le glucose et la fibrine.

Il dédouble l'urée. Un liquide contenant 0,10 c. d'urée n'en contient après 8 jours de culture que 0,08 c. de ce corps.

Ce staphylocoque est donc un ferment mixte agissant à la fois sur les sucres et sur les substances protéiques naturelles ou transformées. Son rôle est donc important dans la putréfaction.

B. coli (variété commune). — Bienstok considérait cette espèce comme possédant, vis-à-vis du *B. putrificus*. une véritable force antagoniste paralysant l'action protéolytique de cet anaérobie. Or Malvoz l'a isolé souvent chez le cadavre. De notre côté, dans tous les examens de viande altérée que nous avons faits, nous l'avons toujours trouvé. Ce n'est que dans les périodes ultimes de la putréfaction, qu'il semble disparaître.

Nous n'avons donc rien à signaler du côté morphologique. Les caractères chimiques de cette espèce sont également bien connus. On nous permettra cependant de les bien préciser, car il est utile d'être bien fixé à leur sujet, pour apprécier d'une façon définitive le rôle de ce bacille dans la putréfaction. Nous avons fait, dans ce but, une série d'expériences en comparant toujours nos variétés avec le coli A.

Comme on le sait, le *B. coli* est un ferment actif des sucres. Toutes ces fermentations, pour se produire, nécessitent la présence de substances azotées et un milieu alcalin, neutre, ou faiblement acide. Nous avons cherché la dose d'acide nécessaire pour arrêter cette fermentation. Elle est de 1,73 p. 1000 en SO^4H^2 pour le coli A de l'Institut Pasteur et de 0,56 pour le coli des putréfactions.

Son action sur les substances protéiques naturelles est nulle ou presque nulle. L'action sur la caséïne signalée par Escherich et Kohler n'est que peu importante.

Mais il transforme très vivement ces mêmes substances hydrolysées. Les syntonines et surtout les protéoses sous son influence se décomposent en donnant des phénols, de l'indol, de l'ammoniaque et du carbonate d'ammoniaque. Le milieu doit être également neutre, alcalin ou faiblement acide.

Dans les milieux mixtes, peptonisés et sucrés, le *B. coli* présente des particularités curieuses. Péré a fait à ce sujet une série d'expériences très nettes, dont je ne rappellerai que celles qui se rapprochent à la peptone.

Il a vu que, en ce qui concerne son action sur le sucre, la nature de l'acide produit dépendait de la nature et de la quantité de la substance azotée.

Avec des sels ammoniacaux, on obtient de l'acide lactique gauche; avec 12 grammes de peptones p. 1000, on a de l'acide gauche et de l'acide lactique droit: en augmentant les peptones. l'acide droit augmente; avec 40 p. 1000 il n'y a plus d'acide gauche. Pour une autre variété de coli, l'acide produit n'est pas sous l'unique dépendance de la substance azotée, mais aussi dans une certaine mesure, de la nature du sucre mis en expérience.

Péré a vu que la bactérie ne touche la peptone que lorsque le sucre a disparu. La présence du sucre garantit la peptone contre la putréfaction. Tant qu'il y aura du sucre, il n'y aura point d'indol. Il y a antagonisme entre ces deux fermentations.

« Quand on cherche la raison. dit-il, on sait qu'elle est due non pas à ce que l'indol serait masqué par un phénomène chimique, mais à ce qu'il n'a pas pris naissance, et comme il se produit dans des solutions acides de peptone, même lorsque l'acidité est due à l'acide lactique, on ne peut songer à une

influence de la réaction acide du liquide. La causalité du phénomène semble résider dans une modification imprimée par la matière hydro-carbonée à la nutrition de la cellule, le microbe, ayant à sa portée du carbone sous une forme qui lui convient, ménages on attaque sur la peptone et n'aboutit pas jusqu'à l'indol. »

Cependant l'auteur admet que la présence de matières azotées est nécessaire pour la fermentation des hydrates de carbone. Il faut donc qu'elles soient utilisées d'une façon quelconque et qu'elles, aussi, soient attaquées.

D'autre part, si à partir de 40 grammes de peptone, le coli n'est plus ferment lactique, est-il encore ferment du sucre?

Pour répondre à ces deux questions, nous avons fait des cultures dans des milieux contenant des doses progressives de peptone et de glucose, sans adjonction de carbonate de chaux. Après 8 jours d'étuve, pendant lesquels on notait chaque jour la réaction, on procédait à l'analyse chimique. A ce propos, il ne faut pas oublier qu'il peut exister de l'ammoniaque dans les peptones mises en expérience, et que, par l'action de la magnésie calcinée sur les substances azotées, il peut s'en produire de faibles quantités. Il faut donc toujours avoir soin de faire une analyse identique sur un tube témoin contenant une quantité équivalente de peptone.

Voici le résultat de nos analyses. Les chiffres donnés correspondent à 1,000 c. c. de liquide.

Glucose.	Peptone.	Réaction du milieu.	Acidité en SO^4H^2	Alcalinité en AzH^3	AzH^3	Indol.	Sucre restant.
1	10	Toujours alcaline.		1,39	Présence.	Réaction nette.	0
2	10	—		1,21	—	Traces.	0
5	10	—		1,04	—	Traces.	0
10	10	Acide. Au bout de 3 jours alcaline.		0,40	—	0	0
15	10	Toujours acide.	0,46		—	0	Sucre.
20	10	—	0,46		—	0	—
30	10	—	0,46		—	0	—
35	10	—	0,46		—	0	—

Ces chiffres nous montrent que pour cette race de coli provenant des putréfactions, la fermentation du sucre s'arrête dans un milieu présentant une acidité de 0,46 en SO^4H^2 ou, ce qui revient au même, quand on ajoute 15 grammes de glucose à un milieu peptonisé.

Si, en outre, on ne trouve pas d'indol tant qu'il reste du sucre, il y a de l'ammoniaque combinée, preuve de l'attaque de la peptone.

Prenons maintenant les doses limites de dextrose 10, 15, 25 et ajoutons de la peptone en dose croissante, toujours sans ajouter du carbonate de chaux.

Glucose.	Peptone.	Réaction du milieu.	Acidité en SO^4H^2	Alcalinité en AzH^3	AzH^3	Indol.	Sucre restant.
10	20	Acide. Alcaline au bout de 6 jours.		0,55	Présence.	0	0
10	30	Acide. Alcaline au bout de 6 jours.		0,62	—	0	0
10	40	Acide. Alcaline au bout de 5 jours.		1,04	—	0	0
15	40	Acide encore après 1 mois 1/2.	0,46		—	0	Sucre.
15	80	—	0,46		—	0	—
15	110	—	0,46		—	0	—
15	160	—	0,46		—	0	—
25	20	Toujours acide (*coli A*).	1,73		—	0	—
25	30	—	1,73		—	0	—
25	40	—	1,73		—	0	—
25	80	—	1,73		—	0	—

N.-B. — Les quatre derniers tubes ont été ensemencés avec le *coli A* des collections de l'Institut Pasteur.

Ainsi, quelles que soient les quantités de peptones, il y a toujours fermentation du sucre. Il y a déviation dans le type habituel de la production d'acide lactique, mais il y a fermentation.

On ne trouve pas d'indol dans les tubes contenant du sucre, mais il en est de même pour les 4 premiers qui n'en contiennent pourtant plus. Enfin, on trouve encore d'une façon constante de l'ammoniaque en quantité beaucoup plus grande que dans les tubes témoins. Il y a donc attaque de la peptone quelle que soit la quantité de sucre.

La présence de l'indol est-elle seule à l'indiquer? Nous savons que non. De nombreux aérobies disloquent les protéoses sans en produire. Certains anaérobies, comme le *putrificus*, etc., qui mènent la désagrégation de l'albumine jusqu'aux corps les plus simples, ne donnent ni phénols ni corps azoïques. La production d'indol n'indique qu'un mode d'attaque, un sens spécial imprimé à la dislocation.

Il est donc probable que le coli agit vis-à-vis des peptones, en présence du sucre, comme vis-à-vis du sucre en présence des peptones. Il y a déviation dans le mode habituel de fermentation.

Nous pouvons donc dire que ces deux attaques se produisent ensemble et qu'une acidité variant avec les races les arrête.

Cette espèce agit aussi sur les dérivés plus éloignés des corps protéiques ou sur des substances similaires existant dans la viande. La créatine est faiblement attaquée : nous n'avons pas pu savoir la nature des corps de dédoublement.

L'urée est transformée en carbonate d'ammoniaque et ammoniaque. Une urine contenant $17^{gr},37$ de ce corps n'en contient plus que $15^{gr},30$ au bout de 8 jours.

L'urée est plus facilement décomposable que la peptone et produit, du fait de sa destruction, plus de substances basiques dans un même temps. Un milieu mixte (sucre et urée) devra donc s'acidifier moins vite si l'attaque des deux corps est simultanée. C'est ce que nous avons vu. En ajoutant à 15 p. 1,000 de sucre, 50 p. 1,000 d'urée, le milieu reste alcalin. On ne peut dire cependant que les acides se soient combinés au fur et à mesure de leur production avec l'urée, car pour neutraliser une culture témoin faite avec la même dose de sucre, il fallait une dose 50 fois plus forte.

Nous savons également que le *B. coli* attaque aussi l'ammoniaque quand il ne lui reste plus d'autres substances assimilables. C'est aussi un dénitrifiant énergique.

D'après tout ce que nous venons de dire, cette espèce peut jouer un rôle assez important dans la putréfaction.

Bacillus filiformis aerobius (espèce nouvelle). — Ce petit bacille est relativement rare dans les processus putrides, on peut le trouver soit au début, soit au bout de 8 à 15 jours. Il semble ensuite disparaître.

C'est un bacille mince, extrêmement grêle, rigide, donnant parfois des filaments dans les vieilles cultures.

Dans les milieux solides ou liquides, il conserve sa forme bacillaire. Il se colore bien par les colorants basiques ordinaires et par la méthode de Gram.

Il est immobile et ne donne pas de spores. Il est tué à 60°.

Sa vitalité est assez considérable. On le réensemence facilement au bout d'un mois.

C'est une espèce facultative poussant à 22° et à 37°.

Sur gélose ordinaire, le développement est lent. Les colonies après 24 heures sont semblables à une fine poussière. 2 jours après elles sont plus apparentes.

Les bords en sont nets, régulièrement arrondis, la surface à peine saillante, le centre acuminé, la coloration grisâtre. Peu à peu, le centre s'épaissit et devient plus opaque. Sur gélose sucrée, le développement n'est guère plus abondant.

En piqûre sur gélatine, il se produit le long de l'ensemencement une strie grise qui peu à peu brunit. Il n'y a pas de liquéfaction.

Il ne pousse pas sur pomme de terre.

Dans la gélose sucrée profonde, les colonies sont régulières, lenticulaires, disséminées dans toute la hauteur du tube, sans production de gaz.

Il trouble le bouillon ordinaire et le bouillon sucré. Après 3 à 4 jours d'étuve, le milieu s'éclaircit et il se dépose une masse visqueuse.

Dans l'urine, la culture se fait de façon identique. Le lait n'est pas coagulé.

Dans les milieux contenant de la viande ou de la fibrine, il n'y a pas de transformation appréciable.

L'analyse chimique de ces divers milieux nous montre que ce bacille attaque faiblement le glucose. Ce n'est qu'au bout de

8 jours que le bouillon sucré présente une légère réaction acide. Il n'attaque pas le lactose.

Il en est de même pour les substances protéiques naturelles. Il agit sur les protéoses en donnant de l'ammoniaque, mais jamais d'indol.

Il décompose l'urée comme le *diplococcus griseus non liquefaciens.*

Ce n'est donc qu'une espèce tout à fait accessoire.

Proteus. — Nous avons vu dans l'historique que le *proteus vulgaris* fut longtemps considéré comme l'espèce principale de la putréfaction. Feltz, cependant, ne put jamais obtenir dans des cultures sur de la viande de l'indol, quoiqu'il y eût production de gaz putride; il en conclut que ce bacille n'avait d'action véritable que sur les albuminoïdes peptonisés. Nos résultats sont un peu différents.

Nous avons isolé deux sortes de proteus, le *vulgaris* et le *Zenckeri.*

(*a*) *Proteus vulgaris.* — Nous ne donnerons pas les caractères morphologiques : ils existent dans tous les traités de bactériologie. Nous insisterons sur les caractères chimiques.

Tout d'abord, nous avons vu, ainsi que l'indiquait Liborius, qu'il n'attaque pas le lactose. En ce qui concerne le glucose, la lévulose, la maltose, la saccharose, Gaillard indique qu'il produit de l'acide acétique. La race que nous avons isolée n'a sur les hexoses, en particulier, qu'une action insignifiante et n'acidifie jamais nettement les milieux qui en contiennent. Dans les milieux faits avec de la viande, on note une émulsion et une saponification des matières grasses.

Il décompose, par contre, les substances protéiques en sécrétant une *diastase* du genre trypsine. Si nous ensemençons cette espèce sur des milieux contenant dans de la fibrine, dans du liquide d'Utschinsky-Frankel, on voit au bout de 24 heures le liquide devenir trouble et dégager, 2 jours après, des gaz fétides. La fibrine est attaquée. Au bout de 15 jours, cette attaque semble se ralentir et s'arrêter. L'analyse montre la présence d'indol, de H^2S, de phénol, d'amines, leucine, acides acétique, formique, butyrique, valérianique. On trouve 0,1597 p. 100 de protéoses. Il y a donc eu attaque. On peut isoler

de cette liqueur une *diastase* agissant surtout en milieu alcalin, neutre ou légèrement acide, mais bien moins active que celle des anaérobies que nous étudierons par la suite.

L'attaque de la caséine ne se fait notamment qu'après l'action d'une *présure*. Le lait ensemencé devient visqueux et dégage une odeur désagréable. Au bout de 6 jours, il se dispose en 3 couches. La crème surnage, les grumeaux de caséine se déposent, et au milieu, on voit un sérum brunâtre. La réaction est toujours alcaline et le lactose intact. A l'analyse, on trouve 0,24 p. 100 de caséoses, de l'indol, H^2S, des phénols, de la leucine et de la tyrosine. Ce n'est donc pas à l'acide qu'est due la précipitation de la caséine, mais bien à une présure.

Cette race de *proteus* transforme rapidement les protéoses en formant les mêmes corps que dans les ballons contenant de la fibrine. Cette action est gênée par les acides, elle est arrêtée avec 0,65 p. 1,000 de SO^4H^2, comme l'avait bien vu Feltz.

Sous son influence, l'urée se dédouble activement. Une urine contenant 19 grammes d'urée ne possède après 3 semaines d'étuve que 6 gr. 40 de ce corps.

Dans les milieux mixtes, glucose et peptone, glucose et urée, son action n'est nullement gênée par la présence de l'hexose qu'il n'attaque pour ainsi dire pas.

b) Proteus Zenckeri. — Cette espèce est fréquente dans les putréfactions.

Elle est surtout aérobie. Elle n'agit nullement sur les sucres, glucose, lactose, etc.

Elle n'attaque pas les substances protéiques naturelles et ne sécrète pas de diastases.

Elle produit avec les protéoses du carbonate d'ammoniaque et de l'ammoniaque, mais jamais d'indol.

ANAÉROBIES

Diplococcus magnus anaerobius (espèce nouvelle). — Ce diplocoque a été isolé dans le cours d'une putréfaction. Il est difficile de le distinguer, dans la viande, des autres cocci. Il se présente dans le bouillon sous la forme d'un gros coccus isolé ou disposé le plus souvent par paires; dans ce dernier cas, les grains sont opposés par une face aplatie. On voit aussi, disséminés dans la préparation, des amas ou de courtes chaînettes. Dans les cultures

vieilles, il n'est pas rare de noter des grains déformés, vésiculeux, pyriformes, etc.

Il se colore bien par les colorants ordinaires et par la méthode de Gram.

C'est un anaérobie strict, poussant à 22° et à 37°. Il est tué par l'ébullition.

Sa vitalité est assez considérable, on peut le réensemencer de cultures de 3 semaines.

Dans la gélose sucrée profonde, au bout de 24 heures à 37°, on voit de fines colonies s'arrêtant à 2 c. c. de la surface. Quand ces colonies sont bien séparées et bien développées, c'est-à-dire au bout de 4 à 5 jours, elles atteignent parfois un diamètre de 1 à 2 millimètres. Vues à la loupe, elles semblent formées de cercles concentriques. Le centre est épais, blanc, les zônes successives sont de plus en plus claires, les bords finement découpés, la surface granuleuse. Il ne se forme pas de gaz.

Dans la gélatine, les colonies apparaissent très lentement dans le fond du tube. Elles sont plus granuleuses et comme floconneuses. Le lait n'est pas modifié.

Le bouillon privé d'air, sucré ou non, se trouble peu à peu; au bout de 4 à 5 jours, il devient clair et laisse déposer une masse visqueuse.

L'urine se trouble au bout de 3 à 4 jours.

Les milieux contenant de la fibrine ne présentent aucune modification appréciable.

L'analyse de ces divers milieux nous montre que ce diplocoque n'a aucune action sur les sucres : glucose, lactose, etc. Les milieux qui en contiennent restent toujours alcalins. Il en est de même pour les substances protéiques naturelles. Il attaque par contre les protéoses en donnant du carbonate d'ammoniaque et de l'ammoniaque, mais jamais d'indol. Dans les milieux mixtes, cette action est la même.

Il dédouble l'urée en carbonate d'ammoniaque. Une urine ayant 17gr,93 de ce corps n'en possède plus au bout de 8 jours que 14gr,50.

Nous devons signaler en terminant que ce microorganisme semble particulièrement favorisant pour le *perfringens*. Cette dernière bactérie, qui meurt si rapidement dans les milieux sucrés, peut vivre dans ces mêmes conditions 15 jours à

3 semaines. Cette particularité semble due à l'alcalinité du milieu constamment maintenue par le diplocoque.

Bacillus gracilis putidus (espèce nouvelle). — C'est un bacille fréquent dans les putréfactions, on l'isole facilement vers la fin de la première semaine. Il est petit, grêle, rigide, beaucoup plus mince que le *putrificus* de Bienstock. Dans les milieux liquides, on le trouve isolé ou disposé en courtes chaînettes de 4 à 5 éléments. Dans les cultures âgées, il donne des formes plus longues.

Il se colore par les colorants basiques, mais il est *décoloré* par la méthode Gram.

Sa vitalité n'est pas considérable. On peut encore le réensemencer de cultures de 15 jours.

Il est *immobile*, ne donne pas de spores et est tué à 100°.

C'est un anaérobie strict.

Il pousse en gélose sucrée profonde jusqu'à 2c de la périphérie. Les colonies ne sont nettes qu'au bout de 48 heures. Elles sont lenticulaires, assez régulières tout d'abord, puis bosselées, marronnées, de coloration gris blanc. Elles atteignent au maximum la grosseur d'une tête d'épingle. Il ne donne jamais de gaz.

Le développement se fait aussi bien dans la gélose ordinaire profonde, toutefois les colonnes sont plus irrégulières, hérissées de piquants.

Il ne liquéfie pas la gélatine, ses colonies y sont semblables à celles de la gélose ordinaire.

Le bouillon, sucré ou non, se trouble ; au bout de 48 heures, il se forme un dépôt pulverulent.

Le lait n'est pas modifié, même après un séjour prolongé à l'étuve.

Ce bacille pousse assez bien dans l'urine.

Toutes ses cultures dégagent une odeur putride très marquée. Quand elles contiennent de la fibrine ou de la viande, on peut voir que les particules solides sont gonflées, désagrégées et prennent une teinte jaunâtre. Le dégagement de gaz est abondant.

Il n'attaque pas les sucres, ni le glucose, ni le lactose, etc. Les milieux qui en contiennent restent alcalins, on y retrouve le sucre intact.

Il sécrète une *lipase*, car dans les milieux contenant de la viande de boucherie, on note une saponification et une émulsion des graisses.

Il transforme nettement les albuminoïdes, Les cultures contenant de la fibrine donnent des protéoses, des amines, des acides acétique, butyrique, valérianique, une faible quantité d'H^2S, pas de phénol ni d'indol. On peut en isoler une *diastase* du *genre trypsine* dont l'activité est peu considérable. Nous avons vu que cette espèce agit peu sur la caséine et la gélatine, elle agit mieux sur la fibrine. L'explication de ce fait se trouve probablement dans la peu d'activité de cette diastase.

Ce bacille transforme les protéoses qu'il a formées en donnant de l'acide acétique, butyrique, de l'ammoniaque et de l'H^2S.

Son attaque de l'urée est assez importante, il l'abaisse dans l'urine de 17 gr. 93 à 13 gr. 87 après 8 jours d'étuve.

Nous ne pensons pas que l'on ait donné une description de cette espèce. Elle diffère du putrificus par son immobilité, l'absence des spores, la décoloration par le Gram, sa petitesse et les caractères de ses cultures. Le *bacillus fragilis* de Veillon s'en rapproche plus. Mais cette dernière espèce est plus grosse, se colore beaucoup plus mal et est bien moins vivace.

Bacillus putrificus coli (Bienstock). — Nous avons vu au début de ce travail comment Bienstock avait été amené à considérer ce bacille comme un anaérobie.

Dans l'intervalle de son mémoire de 1884 et de celui de 1899, d'autres auteurs avaient décrit cette espèce qui, somme toute, est très répandue. Tavel[1] l'avait rencontré dans une péritonite et la description qu'il en donne est excellente. L'un de nous[2], en 1900, postérieurement par conséquent au dernier travail de Bienstock, l'avait signalé dans le méconium. Depuis, Rodella, reprenant l'étude des selles des nouveau-nés, a décrit 3 bacilles qu'il différencie du *Putrificus* par leur action sur le lait, sur la gélatine, leurs caractères de culture. Nous allons voir que ces bacilles, sauf cependant le bacille I, qui est pathogène, doivent être considérés comme des variétés de ce *putrificus*.

Cette bactérie peut en effet se présenter sous des aspects un

1. Tavel, Ueber Pseudotetanusbac. *Centralbl. f. Bakt.* Bd. 23, n° 13, p. 538.
2. Tissier, *Recherches sur la Flore intestinale du nourrisson.*

peu différents qu'il est important de bien définir. Nous en donnerons une description un peu détaillée.

C'est un bâtonnet de 5 à 6 μ de long sur 0,8 μ de large, rigide, à extrémités arrondiés.

Dans les milieux pauvres en albumine, comme des viandes altérées de 4 à 5 mois, e méconium, le bouillon ordinaire, les cultures vieilles en gélose ordinaire profonde ou en surface, il est plus flexueux, comme plissé et filamenteux. Il donne des spores terminales ovales, appendues à l'extrémité du bâtonnet, ce qui lui donne un peu l'aspect du bacille de Nicolaïer. Il est mobile dans les cultures jeunes en milieu liquide. Sa mobilité se ralentit un peu quand il donne des spores. Il se colore bien par les colorants ordinaires et la méthode de Gram. Sa vitalité est considérable, grâce à ces spores qui peuvent supporter une ébullition de 1 à 2 minutes.

C'est un anaérobie strict qui pousse à 22° et à 37°.

Dans la gélose glucosée profonde, il donne au bout de 24 heures de très fines colonies qui ne deviennent nettes qu'au bout de 48 heures. Elles sont d'abord marronnées, bosselées, irrégulières, puis apparaissent, soit sur un point ou sur toute leur surface, de fins prolongements. En se développant, la colonie devient floconneuse ; à la loupe, elle paraît formée d'un noyau central opaque entouré de fines et élégantes arborisations. Il se produit alors des gaz disloquant le milieu qui dégage une forte odeur putride.

Dans la gélose ordinaire, le développement est plus lent. Les colonies sont plus éloignées de la surface, ce qui tient à ce que le milieu ne contient pas de subtances réductrices.

Dans la gélatine, les colonies sont chevelues. Le milieu se ramollit lentement. Il est liquéfié au bout de 5 à 6 jours.

Sur de la gélose ordinaire, maintenue à l'abri de l'air, les colonies sont fines, bleutées, transparentes.

Le bouillon ordinaire ou sucré se trouble au bout de 24 heures. Le dépôt qui s'y forme est fin, granuleux. Il dégage une odeur fétide.

Le lait ensemencé dans les mêmes conditions d'anaérobiose prend au bout de 4 à 5 jours une teinte rosée ou mieux jaune ocre. Il devient petit à petit transparent. La couche superficielle crémeuse laisse voir de fins grumeaux de caséine qui ne tardent

pas à se déposer au fond du vase. Le sérum est jaune vert clair Progressivement, la caséine disparaît complètement.

L'urine se trouble comme le bouillon, mais d'une façon moins nette.

Les milieux contenant de la fibrine ou de la viande, sucrés ou non, se troublent, dégagent des gaz à odeur fétide. Les particules solides se gonflent et disparaissent, laissant un résidu noirâtre pulvérulent.

Telle est la description de la variété la plus fréquente, mais il n'est pas rare de trouver des races moins actives. Certaines n'agissent que très peu sur le lait, ne font que ramollir la gélatine au bout d'un temps plus ou moins long, attaquent faiblement la fibrine. C'est le cas des variétés provenant de milieux pauvres en albumine, de putréfactions anciennes, de vieilles cultures, du méconium, de l'estomac ou de l'intestin du chien, etc. Ce n'est qu'au moyen d'un examen attentif des caractères chimiques que l'on voit qu'il s'agit bien de la même espèce dont la puissance de la diastase est simplement diminuée.

Ajoutons que cette espèce, comme l'a bien indiqué Bienstock, n'est pas pathogène pour les animaux de laboratoire.

Ses caractères chimiques sont les suivants :

Il attaque la glucose d'une façon insignifiante [1]. Les milieux qui en contiennent ne sont jamais nettement acides. Il est sans action sur le lactose.

Il sécrète une *lipase*, car il émulsionne et saponifie les graisses dans les milieux faits avec de la viande.

Il transforme rapidement les substances protéiques naturelles. Dans l'attaque de la fibrine on trouve, comme l'ont dit MM. Bienstock et Wallach, de l'H^2S, mais jamais de phénols et d'indol, des protéoses dont la quantité diminue avec l'âge de la culture, des amines, de la leucine, tyrosine, de l'ammoniaque, des acides acétique, butyrique, valérianique, paraoxyphénlypropionique. Au bout de 3 semaines, sur 30 grammes de fibrine, on ne trouve que 0,02 0/0 d'albumine insoluble ; 0,1285 0/0 de protéoses et 0,70 0/0 d'extractif.

1. Au moment de mettre sous presse, nous avons eu connaissance du travail de M. Achaline (*Annales de l'Institut Pasteur*, n° 9, sept. 1902). Pour cet auteur le putrificus attaquerait le maltose, le glucose, le galactose, au point d'arrêter les cultures contenant à la fois de l'albumine et un de ses sucres. Nous n'avons pas constaté ce fait dans nos nombreuses expériences. Cette attaque des sucres nous a paru insignifiante. Nous devons ajouter que ces résultats concordent avec ceux qu'a obtenus Bienstock.

On y trouve également de ces bases toxiques ou *ptomaïnes* ayant tous les caractères des alcaloïdes. Leur quantité est moindre, cependant, que dans une viande putréfiée par l'action de toutes les espèces réunies, ce qui prouve que ce bacille n'est pas le seul à les produire.

Cette attaque si active des albuminoïdes se fait par l'intermédiaire d'une *diastase trypsique* qu'il est facile d'isoler par le procédé indiqué. Elle se montre très active, digère en 8 à 15 jours 30 grammes de fibrine. Son action est paralysée par les acides. La dose d'arrêt est de 1.75 0/00 évaluée en SO^4H^2.

Il est intéressant de faire l'analyse de cette fibrine digérée sous l'action de cette diastase, pour établir jusqu'à quel point ce ferment désintègre la matière albuminoïde. Il ne se produit aucun dégagement de gaz. On ne trouve pas d'acides gras ou aromatiques, ni de phénols. Les protéoses sont en grande quantité. On peut déceler la présence d'amines, de leucine et de tyrosine. Néanmoins, le poids d'extractifs est faible. Les autres produits résultent donc de l'action du bacille sur les protéoses.

Le *putrificus* agit également sur la caséine. Agit-il directement par sa diastase, ou après l'action d'une *présure* qui le précipite en fins grumeaux? Nous ne pouvons rien affirmer, n'ayant pas isolé ce dernier ferment. En tout cas la substance albuminoïde est presque entièrement transformée dans le lait. On y trouve des caséoses et toutes les substances que nous avons indiquées plus haut. En examinant une culture faite avec du plasmon, il ne reste après trois semaines que des traces de substances précipitables par l'acide acétique. Le poids d'extractif = 0,74 0/0 ; les caséoses = 0,44 0/0. Les substances collagènes sont transformées d'une façon aussi rapide.

Les dérivés des corps protéiques sont attaqués également, en produisant des acides gras et aromatiques, de la leucine, de la tyrosine, de l'ammoniaque.

Les dérivés ultimes, comme l'urée, sont dédoublés. Une urine contenant $17^{gr},93$ d'urée n'en contient après 8 jours que $11^{gr},5$.

Ce bacille est donc, comme l'a dit Bienstock, une espèce de la plus grande importance dans la putréfaction.

Nous l'avons comparé au bacille tétanique. Les différences morphologiques sont peu importantes, mais au point de vue chimique et surtout biologique, la dissemblance est grande. Le

bacille de Nicolaïer sécrète une diastase peu active sur les albuminoïdes et les protéides, plus sur les subtances collagènes. Il donne en outre de l'indol avec les protéoses. Par contre il donne une toxine redoutable. Pour le putrificus c'est l'inverse, il ne donne pas de toxine, mais la diastase est très puissante.

Bacillus perfringens (Frankel, Welch et Nuttal, Veillon et Züber). Ce bacille fut d'abord isolé par Frankel[1] dans un cas de gangrène gazeuse, puis par Welch et Nuttal chez le cadavre. En 1898, Veillon et Züber purent, au moyen de méthodes nouvelles, le trouver dans les appendicites. Ils en donnèrent une description complète et détaillée.

Depuis, Guillemot, Rist, Cottet purent le retrouver dans des suppurations fétides.

C'est une espèce commune. On la rencontre fréquemment dans la putréfaction, surtout au début. Elle semble diminuer à un moment donné, puis disparaître.

Ses caractères morphologiques sont connus, nous ne pouvons les donner ici.

Jusqu'ici ses propriétés chimiques n'ont pas été étudiés : nous avons donc pensé qu'il nous était nécessaire de bien les connaître pour déterminer son rôle dans la putréfaction.

Ce bacille saccharifie l'amidon, attaque les sucres d'une façon très intense, au point qu'il ne se développe vraiment bien que dans les milieux contenant ces hydrates de carbone.

Dans les cultures de 24 heures, glucosées, la réaction est déjà très acide. Cette transformation est tellement intense et accompagnée d'un tel dégagement de gaz à 37°, que les milieux sont disloqués complètement en 48 heures et que l'acidité produite suffit à arrêter la culture. Ce fait avait déjà été nettement indiqué par Veillon et Züber. Le glucose, le lactose sont dédoublés et brûlés avec production de gaz hydrogène, CO^2, susceptibles de faire éclater les ballons fermés, et formation d'acides acétique, butyrique, propionique, lactique. Dans les cultures sur viande de boucherie, on peut voir que ce bacille sécrète une *diastase* émulsionnant et saponifiant les graisses.

Il attaque également les substances protéiques, en sécré-

1. Frankel, *Ueber Gazphlegmonen*, Voss, Hamb. u. Leipsig, 1893.
Veillon et Zuber, *Arch. de Méd. expérim.*, 1898, p. 539

tant une *diastase* du type trypsine. Si nous examinons par exemple, au point de vue chimique, un ballon contenant de la fibrine dans du liquide d'Utschinsky-Frankel, on trouve au bout d'un mois de culture à 37° des gaz CO^2, H^2S, de l'indol, des phénols, des protéoses, ($6^{gr},51$ p. 350 grammes de liquide,) des traces d'albumine insoluble, des amines, leucine, tyrosine, urée (1,5 p. 100) de l'ammoniaque et du carbonate d'ammoniaque (0,25 p. 100) des acides propionique, butyrique, valérianique.

On extrait de ce liquide, par le procédé de Conheim, une diastase assez active qui digère la fibrine sans production de gaz ni d'indol ou de phénols. Cette diastase s'arrête dans un milieu contenant 1,50 à 1,70 de SO^4H^2 p. 1000.

Dans un milieu mixte contenant à la fois du sucre (15 p. 1000) et de la fibrine, l'attaque des deux corps en présence se fait jusqu'à ce que le milieu atteigne l'acidité d'arrêt. L'adjonction de carbonate de chaux à un milieu identique, fait que tout s'y passe comme dans un milieu non sucré.

L'action sur le sucre, si elle paralyse à un moment donné l'action de la diastase, ne le fait pas au début, car l'analyse nous montre dans une de ces cultures arrêtées la présence de trace d'indol, H^2S, amines, leucine, etc.

Tout s'est donc passé comme s'il y avait eu *attaque simultanée.*

Le *Perfringens* transforme la caséine et la brûle. Du lait de vache ensemencé se coagule en 24 heures par le fait de l'action sur le lactose. On trouve, à côté des acides produits, des caséoses des amines, etc., en petite quantité. On peut obtenir une digestion complète de cette caséine en ajoutant au lait du carbonate de chaux. Il s'y produit alors de l'indol, de l'H^2S, des caséoses et les autres substances extractives. Son action sur le plasmon est en tous points comparable.

Les protéoses sont transformés rapidement avec production d'indol, d'H^2S, de gaz fétides, et de substances plus simples : amines leucine, tyrosine, ammoniaque, acides gras, etc.

Le *Perfringens* détruit encore l'urée. Dans une urine contenant $17^{gr},93$ de ce corps, on n'en trouve après 8 jours d'étuve que $11^{gr},53$.

Cette espèce joue donc un rôle capital dans la putréfaction, grâce à ses *fonctions mixtes* de ferments des sucres et de l'ami-

don, des albuminoïdes et des graisses. C'est la seule espèce que nous ayons trouvée ayant une secrétion analogue à la pancréatine, c'est-à-dire comprenant 3 diastases : *trypsine*, *amylopsine* et *lipase*.

Bacillus bifermentans sporogenes (espèce nouvelle). — Ce bacille se trouve surtout au début de la putréfaction, il devient ensuite moins abondant et semble disparaître. Ses caractères le rapprochent beaucoup du *Perfringens*. Son rôle semble être identique. Il ne nous semble pas avoir été décrit jusqu'ici.

C'est un gros bacille de 5 à 6 μ de long et plus, et de 0,8μ à 1 μ de large, plus gros que le *putrificus*. Dans les milieux liquides, il donne souvent des chaînettes de bâtonnets de 5 à 6 éléments. Dans les milieux solides, ses formes sont un peu plus longues, mais cependant jamais filamenteuses.

Il donne rapidement des spores, au bout de 24 heures, et plus tardivement quand le milieu est sucré. Ces spores se forment au milieu du bâtonnet qui alors semble péricliter et ne prend plus la coloration.

Il se colore bien par les méthodes usuelles et garde la couleur par la méthode de Gram.

Il est immobile. Sa vitalité est considérable grâce à ses spores qui supportent la température de 100° pendant une minute et demie. Il ne se colore jamais par l'iode, même pendant cette formation de spores.

C'est un anaérobie strict qui pousse à 22° et à 37°.

En règle générale, il ne se développe bien que dans les milieux glucosés. Dans la gélose profonde, on voit apparaître au bout de 24 heures des colonies très régulières blanc grisâtre, qui ne sont bien apparentes qu'après 48 heures. Après 3 jours d'étuve, le milieu commence à se disloquer par la production des gaz. Il dégage une odeur désagréable.

Quand les cultures sont un peu âgées, au bout d'une semaine ou deux, ces colonies lenticulaires présentent des bosselures qui semblent être des rejetons de la colonie principale. Elle se disposent d'une facon irrégulière, ou parfois en couronne autour d'une noyau central. Elles ne deviennent jamais chevelues ou cotonneuses, comme celle du *Putrificus*.

Dans la gélatine sucrée profonde, l'aspect des colonies est

identique, les gaz apparaissent lentement, et ce n'est qu'au bout d'un mois que le milieu se ramollit et se liquéfie peu à peu.

Dans le bouillon ordinaire, il pousse assez mal : au bout de 48 heures, le liquide se trouble et laisse déposer une masse visqueuse. Dans le bouillon sucré, la culture est typique, le dépôt est muqueux, adhérent au fond du vase, ne se laisse détacher que par une forte agitation. Il vient flotter alors dans le liquide comme une masse zoogléique de moisissure.

Le lait ne se modifie qu'au bout de 5 jours. La caséine se précipite sous la forme de fins caillots microscopiques, le beurre surnage. Le sérum est blanc jaunâtre.

La caséine finit par se ramollir et disparaître.

Il pousse dans un milieu fibriné en donnant des gaz très fétides.

Il attaque le glucose d'une manière assez active, acidifiant les milieux qui en contiennent. Un liquide contenant une substance azotée et 15 p. 1.000 environ de sucre n'en contient au bout de 10 jours que 8 grammes p. 1.000. La culture est alors arrêtée. On n'y trouve pas d'alcool, mais de l'acide acétique et butyrique et pas d'acide lactique. Il est sans action sur le lactose que l'on trouve intact dans le lait peptonisé.

Il n'a aucune action sur l'amidon.

Les graisses, dans les milieux contenant de la viande, sont émulsionnées et saponifiées sous l'influence d'une *lipase*.

Les substances protéiques : albuminoïdes, protéides, albumoïdes, sont transformées au moyen d'une *diastase*, du type trypsine, peu active.

Il décompose la fibrine en donnant de l'indol, de l'H^2S, des protéoses, des amines, de la leucine, de la tyrosine, des acides gras et aromatiques, de l'ammoniaque. Il n'agit que très lentement sur les substances collagènes. Il semble mieux attaquer la caséine que les autres corps protéiques en donnant les mêmes composés.

Les protéoses sont décomposées en indol, H^2S, acides amidés et ammoniaque.

Dans les milieux mixtes il ne donne plus d'indol, et l'acidité arrête la culture.

Il ne produit aucune toxine. Il n'est pas pathogène pour les animaux de laboratoire.

Ce bacille diffère du *B. butyricus*, du bacille de Botkin, de Klecki, de Fitz, qui se colorent par l'iode. L'*orthobutylicus* de Grimbert est mobile et attaque l'amidon. C'est un ferment mixte, moins actif que le *Perfringens*.

C'est une espèce très importante dans la putréfaction.

GROUPEMENT DES BACTÉRIES DE LA PUTRÉFACTION; LEUR ACTION COMPARÉE

Il est facile de voir, d'après ce que nous venons de dire au sujet de leurs caractères chimiques, que les bactéries de la putréfaction forment deux groupes principaux: les *ferments mixtes* et les *ferments simples*.

Les premiers attaquent à la fois les hydrates de carbone et les substances protéiques. Ils se subdivisent d'après leur action sur les albuminoïdes naturels. Les uns attaquent directement l'albumine en sécrétant des diastases trypsiques. Ce sont les *protéolytiques mixtes : B. perfringens*, *B. bifermentans sporogenes*, le *Staphylocoque blanc*, le *micrococcus flavus liquefaciens*, le *proteus vulgaris*. Les autres n'attaquent ces substances que lorsqu'elles ont subi une première hydratation. Ce sont les *peptolytiques mixtes* pour ainsi dire : *B. coli*, *streptocoque pyogène*, *diplococcus griseus non liquefaciens*, *B. filiformis*.

Les ferments simples ne s'attaquent pas au sucre au moins d'une façon appréciable, leurs milieux restent toujours alcalins ou le deviennent rapidement. On peut aussi les subdiviser en *protéolytiques vrais* et *peptolytiques*. Les premiers sont le *B. putrificus*, le *B. putidus gracilis*. Les seconds n'attaquent que les peptones : le *diplococcus magnus anaerobius*, le *proteus Zenckeri*.

Les espèces, véritablement essentielles pour disloquer la molécule albuminoïde et produire une putréfaction type, seront ces protéolytiques vrais, mixtes ou non. Mais, si nous isolons leurs diastases, si nous les comparons entre elles, nous voyons que les plus actives sont de beaucoup celles des anaérobies, et parmi elles celle du *B. putrificus*. C'est bien ce qu'avait vu Bienstock.

Comment maintenant vont se grouper ces diverses espèces dans une putréfaction naturelle?

Nous voyons que *toujours* il existe un ou plusieurs anaéro-

bies, espèces nécessaires, et que *toujours* également il existe des aérobies dont le rôle n'est qu'accessoire. Nous trouvons, par exemple : dans un cas, du *B. coli*, du *streptocoque pyogène*, mais aussi du *B. bifermentans sporogenes* et du *B. Putrificus ;* dans un autre cas de multiples aérobies : *B. coli*, *diplococcus griseus non liq.* le *proteus Zenckeri*, le *B. filiformis*, mais avec eux le *B. perfringens* le *B. putrificus*, le *B. putidus gracilis ;* dans un autre cas encore, le *B. coli*, le *staphylocoque blanc*, le *Proteus vulgaris*, mais aussi le bacille anaérobie *B. putrificus*. etc. Point important, on trouve toujours cette dernière bactérie.

Mais si les anaérobies sont des espèces capitales, quel est le rôle de ces aérobies qui les accompagnent constamment ? Agissent-ils comme *empêchants* ou *favorisants ?* Jusqu'ici, ce point n'a été, croyons-nous, étudié que par Bienstock. Cet auteur avait vu, en 1899, que les bactéries de l'intestin (*B. coli* et *B. lactis aerogenes*) gênent ou arrêtent la putréfaction de la fibrine. « Ce phénomène d'arrêt par ces deux bacilles, disait-il, éclate plus distinctement encore dans le lait. On sait depuis longtemps que le lait non bouilli empêche la putréfaction, et on en a attribué la cause au lactose. Eh bien, j'ai trouvé que le lait stérilisé, loin de gêner la putréfaction, la favorise. De la fibrine dans du lait stérilisé et ensemencé avec le *B. putrificus* soit pur, soit mélangé avec 20 espèces aérobies, se décompose rapidement. Au contraire, avec le *B. coli* et le *B. lactis*, le lait stérilisé se comporte avec le *putrificus* tout comme dans le lait non bouilli. Ce qui me fait conclure que l'agent antiputride du lait non bouilli n'est pas le lactose, mais la *force antagoniste* de ces deux bacilles qu'on y rencontre toujours. Ce fait me paraît devoir être rapproché de cet autre que la décomposition du contenu intestinal ne va jamais aussi loin que celle de la fibrine putréfiée hors du corps de l'animal, ce qui est sûrement dans l'intérêt de l'organisme. »

Cette déduction était trop importante pour que nous ne cherchions pas à la vérifier et à savoir à quoi était due cette force antagoniste que cet auteur avait mise le premier en lumière.

Nous avons donc ensemencé le *B. putrificus* et le *coli* dans un milieu d'Utschinsky-Frankel contenant de la fibrine et 15 p. 1,000 de sucre. Le coli provenait tantôt de l'intestin, tantôt des putréfactions.

Au bout de 1 à 2 jours de culture à 37°, on voit se produire un dégagement abondant de gaz d'odeur légèrement putride, puis au bout de 3 à 4 jours, la production de gaz cesse, la culture semble s'arrêter. La fibrine n'est que peu attaquée, ce que nous indique l'analyse chimique. Nous avons ainsi conservé pendant des mois des ballons où la fibrine était restée absolument dans le même état. On peut donc dire que dans ces conditions ces bactéries sont *des espèces empêchantes.*

Mais quelle était la cause de cet arrêt ? Nous avons changé de milieu, nous nous sommes servis du même liquide, mais sans sucre, avec de la fibrine bien lavée, le tout ne contenant pas la moindre trace de substances hydrocarbonées à l'analyse.

Or, avec ces *mêmes espèces*, nous avons vu la putréfaction suivre son cours normal et même, à vrai dire, mieux que lorsque le *putrificus* était ensemencé seul. Avec de la fibrine sanglante, résultat identique. La cause du phénomène résidait donc bien dans la présence du glucose. Ce n'est pas ce corps qui empêche la putréfaction par lui-même, (car il n'a aucun effet dans une culture de protéolytique pur), mais ce sont les produits élaborés pendant la destruction de cette substance par le *B. coli*, c'est-à-dire les acides. Nous avons donc mis dans ces milieux sucrés du carbonate de chaux et tout s'y passait comme en des milieux sans glucose.

Il est donc évident que l'*acidité du milieu seule* arrêtait la culture.

Il nous a paru intéressant de chercher si les autres bactéries de l'intestin jouaient également ce même rôle vis-à-vis du *Putrificus* en présence des hydrates de carbone, et nous avons successivement ensemencé, avec cette espèce de streptocoque intestinal, et du *Bifidus*. Nous avons pu alors nous rendre compte que l'arrêt de la putréfaction est plus rapide encore. L'analyse chimique nous en a donné la cause. Avec 15 p. 1,000 de glucose dans ce liquide minéral en présence de fibrine, le coli de l'intestin du nourrisson donne une acidité évaluée en SO^4H^2 de 1,673 p. 1000, le streptocoque intestinal : 2,031, le *B. bifidus*, 2,089.

Nous rappellerons simplement, à ce propos, que l'un de nous avait déjà vu l'*action empêchante* de ce *B. bifidus*, *in vitro*, non seulement sur des espèces anormales de l'intestin, mais aussi sur

le *B. coli*, et qu'il était impossible de faire pousser cette dernière bactérie dans des tubes ayant contenu l'anaérobie, si l'on ne prenait la précaution de neutraliser le milieu et d'y ajouter des peptones. On peut donc attribuer également, pour une part, cette action empêchante à l'acidité produite.

Le bacille d'Eberth *empêche* également, quoique plus faiblement, la putréfaction de la fibrine par le *putrificus* en milieu glucosé.

Cette action du *B. coli* se poursuit-elle sur les autres microbes des processus putrides? Nous avons successivement fait la même symbiose avec les autres espèces isolées, et en général on peut dire que cette action n'existe que sur les protéolytiques et les peptolytiques purs. Sur les autres espèces, ferments mixtes, comme le *Perfringens*, il ne se produit rien de particulier. On sait, en effet, que cette espèce est elle-même un ferment très actif du sucre, qu'elle produit quantité d'acides qui arrêtent d'eux-mêmes les cultures glucosées, quand on n'a pas pris le soin d'y ajouter du carbonate de chaux.

En réunissant toutes les espèces avec du *coli intestinal* dans ce milieu fibriné avec 20 0/00 de sucre, le résultat est identique : il y a arrêt. En les repiquant dans un milieu semblable avec du carbonate de chaux, la putréfaction se fait normalement. En ajoutant à ce milieu glucosé une substance facilement décomposable et produisant beaucoup d'ammoniaque, comme l'urée, ces espèces réunies se comportent comme avec le carbonate de chaux.

On peut répéter ces expériences avec du lait, les résultats seront les mêmes et plus marqués, qu'il soit stérilisé ou non, car nous savons que ce liquide organique contient 40 0/00 d'hydrates de carbone.

Ainsi *cette force antagoniste* des ferments du sucre, vis-à-vis des protéolytiques, en présence de matières sucrées, existe bien, comme l'a dit Bienstock, mais *elle est due uniquement à la quantité des acides qu'ils produisent.*

Comment maintenant une viande pourra-t-elle se putréfier? Elle contient du sucre et, parmi les bactéries qui vont la détruire, il y a des ferments du sucre? Examinons avec soin la réaction d'une viande qui s'altère. Nous savons qu'elle contient environ 10 0/00 de sucre évalué en dextrose, puis d'autres substances

extractives, créatine, xanthine, sels minéraux, etc. Au bout de 4 heures elle est acide (0,890/00 en SO^4H^2), de 24 heures (1,129) mais déjà on trouve des peptones, de l'ammoniaque qui vont sans cesse en augmentant. Au bout de 40 heures l'acidité est de 0,841, de 48 heures 0,561. A ce moment, elle dégage un peu d'H^2S en très petite quantité. L'ammoniaque augmente. La viande devient alcaline après 4 ou 5 jours à la température de 20°. Ce dernier point est important.

Ainsi, comme on peut le voir, la putréfaction se produit très bien malgré le sucre.

Reportons-nous aux tables que nous avons données pour le *B. coli*: nous voyons que la dose de 10 grammes de sucre ne produit pas assez d'acide pour arrêter l'action sur les dérivés des albuminoïdes. Il en est de même pour les autres ferments mixtes que nous avons étudiés. Par conséquent ils pourront donc continuer leur production d'ammoniaque.

Mais aux dépens de quelle substance pourront-ils former l'ammoniaque? Il n'y a pas de peptones dans la viande absolument fraîche, l'urée n'est qu'à l'état de traces, les autres corps de la série xanthique, urique, etc., sont dans les mêmes proportions. Il y a 2 à 4 0/00 de créatine ; mais, en admettant que cette substance soit facilement transformable, elle serait loin de pouvoir produire toute l'ammoniaque nécessaire. Cette base ne peut donc se former qu'aux dépens de protéoses nouvellement fabriquées par l'action des diastases microbiennes. Ces diastases sont sécrétées dans les premières 24 heures, puisque c'est alors que l'acidité commence à décroître, bien que le sucre n'ait pas encore totalement disparu.

La dose d'acide de 1,129 produite par la combustion des sucres ne peut que ralentir, mais non pas paralyser l'action de ces diastases trypsiques.

Ainsi ces mêmes aérobies, qui dans certaines conditions sont empêchants, deviennent, dans les conditions habituelles où se trouve la viande de bœuf, des *favorisants*, puisqu'ils hâtent la production d'ammoniaque servant à neutraliser le milieu.

Si nous ajoutons à cette dernière propriété leur action désoxydante, nous voyons qu'ils ne sont pas loin d'être tout à fait essentiels.

Seuls, ces aérobies sont évidemment impuissants à faire une

putréfaction, en exceptant toutefois le *staphylocoque* et le *proteus*. Seuls, les anaérobies y parviennent, mais d'une façon plus lente et dans un milieu privé d'air. La symbiose constante de ces deux catégories de bactéries nous représente donc la meilleure combinaison possible pour la putréfaction rapide de la viande.

Nous pouvons, dès lors, reproduire une putréfaction naturelle, la faire évoluer comme il nous plaira, l'activer ou la ralentir, l'arrêter ou la faire reprendre, sans nous servir d'antiseptique. En effet, en ajoutant des acides, nous arrêtons et l'action des diastases et l'action sur les protéoses. En mettant 1 0/00 de SO^4H^2 dans un liquide contenant une viande de 24 heures, ou un autre acide en quantité équivalente, on arrête la putréfaction; avec 0.50 0/00, on peut la retarder de 15 jours au moins. Si l'on additionne ce chiffre de 1 0/00 à celui qui existe dans la viande, ou 1,129, on obtient 2,129, quantité suffisante pour arrêter toute action diastasique. Les bactéries n'y seront pas tuées, car on peut les reensemencer sur de la viande ou de la fibrine, et obtenir une putréfaction type. Il est clair que si la viande est moins fraîche, il faudra ajouter une dose d'acide plus élevée.

Cette propriété des substances à réaction acide, de ralentir ou d'arrêter les putréfactions, est connue depuis longtemps. Pour faire « mariner » une viande, il est prescrit dans les livres de cuisine d'y ajouter une forte proportion de vinaigre. On peut de même faire produire l'acidité d'arrêt par les microbes eux-mêmes, en ajoutant des hydrates de carbone. Dans les mêmes conditions, 5 0/00 de glucose donnent un résultat identique. En nous reportant aux formules employées pour la conservation des substances albuminoïdes, nous trouvons que la saumure contient pour 0/00 d'eau pure NaCL = 125 grammes. Azotate de potasse = 4 grammes. Sucre = 5 grammes. La réaction est acide.

MARCHE D'UNE PUTRÉFACTION

Nous devons envisager maintenant comment et dans quel ordre apparaissent les bactéries de la putréfaction.

Tout d'abord : *la viande prise à la boucherie, aussi fraîche que possible, contient tous les germes nécessaires à sa complète putréfaction,*

germes qui ne se multiplieront que lorsque le milieu leur est devenu favorable.

Étudions la putréfaction au contact de l'air. Nous connaissons la composition d'une viande fraîche, nous l'avons indiquée; nous savons que dès les premières heures la fermentation des sucres est active et qu'il se produit une attaque légère des albuminoïdes puisque dès 24 heures on trouve : protéoses = 1,56 0/0, poids d'extractifs, 1gr,17 0/0, leucine, tyrosine, amines, trace, d'ammoniaque. Les ensemencements nous montrent des aérobies, ferments mixtes; *Micrococcus flavus liq.*, *staphylocoque blanc*, *B. coli*, *streptocoque pyogène*, *diplococcus griseus non liq.*, *B. filiformis*.

Au bout de 3 à 4 jours, la réaction acide est moins nette; l'attaque des albumines a beaucoup augmenté : l'odeur commence à être légèrement putride. Le milieu étant désoxydé, les anaérobies vont apparaître. Ce ne sont encore que des ferments mixtes : *B. perfringens*, *B. bifermentans sporogenes*.

Au bout de 8 à 10 jours, le sucre a disparu, les matières grasses saponifiées sont devenues des savons ammoniacaux, la glycérine est brûlée, l'odeur est très fétide. Les peptones atteignent 2,40 0/0, le poids extractif = 2,47 0/0. Tout indique l'attaque rapide de la matière protéique, (présence de phénols, d'indol, H^2S, d'amines, d'ammoniaque, etc.). On trouve alors les ferments protéolytiques. *B. putidus gracilis*, *B. putrificus* et des peptolytiques purs : *diplococcus magnus anaerobius*, *proteus Zenckeri* en plus des bactéries précitées.

Au bout de 3 semaines, un mois, l'analyse chimique indique que l'attaque se produit plus à fond, que les protéoses et les corps extractifs eux-mêmes subissent l'action bactérienne. Les peptones (1,658 0/0) diminuent ainsi que le poids d'extractif (1,404). Indice que les produits solubles dans l'alcool, leucine, tyrosine, acide aspartique sont, eux aussi, atteints. L'ammoniaque augmente pour atteindre 1,50 0/0. Les ferments protéolytiques mixtes se montrent moins vivaces et moins nombreux dans les isolements. Ils vont disparaître peu à peu pour laisser la place aux protéolytiques purs qui vont pulluler.

A partir de cette époque, l'attaque semble se ralentir. L'albumine insoluble est peu abondante, les peptones sont en voie de décroissance. Vers le 50e jour, elles sont encore de 1,399 0/0. Le

B. perfringens a disparu. Le *B. putrificus* commence à donner des spores, les aérobies sont moins nombreux, on note encore le *B. coli*, le *diplococcus griseus non liq.*, le *B. filiformis*.

Au bout de 3 mois, les espèces restantes ne vivent plus que sur les déchets et les substances dérivées. Les protéoses = 0,488, le poids d'extractifs = 1,24. Au bout de 4 mois, la viande est devenue une masse noirâtre, visqueuse, ne dégageant plus d'odeur. Elle ne contient plus de peptones, le poids d'extractifs = 0,192, l'ammoniaque = 0,13. Les isolements ne montrent plus que du *B. putrificus* et du *B. graciles putidus*, des aérobies, il ne reste que le *diplococcus griseus non liq.*

Telle est la marche résumée d'une putréfaction au contact de l'air.

Quand le milieu est privé d'air, l'action désoxydante des bactéries aérobies n'a plus besoin de se produire et l'apparition des anaérobies est plus rapide, mais elle se fait cependant dans un ordre identique.

Toutes les espèces existaient dès le début, car nous nous sommes servis de la même viande, répartie dans des ballons bouchés et stérilisés.

En résumé, on peut considérer deux phases dans la putréfaction d'une viande de bœuf :

1° *Phase des ferments mixtes protéolytiques et peptolytiques* qui détruisent le sucre et attaquent l'albumine. Les protéoses produites sont reprises et leur destruction donne l'ammoniaque nécessaire à neutraliser et à alcaliniser le milieu ;

2° *Phase des ferments purs protéolytiques et peptéolytiques* qui achèvent l'attaque de l'albumine et de ses dérivés ultimes.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

Des lésions des ganglions nerveux périphériques

DANS LES MALADIES INFECTIEUSES

Par Osw. GOEBEL

(Travail du laboratoire de l'Institut pathologique et bactériologique de Liége).

On doit à MM. van Gehuchten et Nelis[1] la découverte d'une lésion toute particulière rencontrée par ces savants dans les ganglions nerveux périphériques, chez les animaux ayant succombé à la rage des rues. On sait que les coupes des ganglions spinaux et du ganglion noueux du pneumogastrique montrent, à l'état normal, de belles cellules nerveuses entourées d'une gaine de cellules endothéliales plates formant une véritable capsule : les cellules nerveuses, très nombreuses dans ces ganglions, occupent complètement la capsule qui leur est réservée. Mais dans plusieurs cas de rage des rues, MM. van Gehuchten et Nelis observèrent la disparition de nombreuses cellules nerveuses au sein de ces ganglions périphériques cérébro-spinaux et sympathiques, et leur remplacement par de petites cellules rondes. Ces cellules résultaient de la prolifération des éléments de la capsule endothéliale entraînant à sa suite, suivant la manière de voir de MM. van Gehuchten et Nelis, la destruction des cellules nerveuses. Mais cette dernière était loin d'être toujours complète; par places, on retrouvait des cellules nerveuses présentant des lésions variées du noyau et du protoplasme, et logées dans une capsule endothéliale à peine modifiée. C'est chez le chien que les lésions se présentèrent avec le plus de netteté et d'intensité; chez le lapin et chez l'homme, on ne trouvait le plus souvent qu'une accumulation de petites cellules rondes entre la capsule et la cellule nerveuse, mais la disparition complète de cette dernière était moins constante que chez le chien.

1. Van Gehuchten et Nelis. Les lésions histologiques de la rage chez l'homme et chez les animaux, *Bull. Acad. Méd. de Belgique*, 1900. Nelis. Étude sur l'anatomie et la physiologie de la rage, *Archives de biologie*, 1900.

MM. van Gehuchten et Nelis insistèrent avec raison sur l'intérêt de leur découverte. Non seulement ils pensèrent que cette lésion pouvait être utilisée avec le plus grand fruit pour le diagnostic *post mortem* de la rage, mais ils se demandèrent si la pathogénie de cette maladie infectieuse ne devait pas être comprise d'une tout autre façon qu'on l'avait enseigné jusqu'à ce moment. Ils proposèrent une théorie de la physiologie pathologique de la rage, suivant laquelle les symptômes principaux seraient dus surtout aux altérations des ganglions périphériques : ainsi l'animal enragé, suivant cette conception, serait paralysé non pas à la suite d'altérations des neurones moteurs, mais à cause de l'insensibilité consécutive aux lésions des voies sensibles. L'hyperexcitabilité extrême de la peau, des tendons et des muscles correspondrait à l'état d'irritation des cellules nerveuses des ganglions. Il est inutile de rappeler que la majorité des pathologistes expliquaient, au contraire, l'ensemble des symptômes principaux de la rage par des lésions diffuses de l'axe cérébro-spinal lui-même.

Dès les premières publications de MM. van Gehuchten et Nelis, nos maîtres, MM. les professeurs Firket et Malvoz, nous engagèrent à instituer toute une série de recherches sur la question si intéressante soulevée par leur savant collègue de l'Université de Louvain. Si la rage était la suite des altérations ganglionnaires, les lésions devaient se retrouver chaque fois que la symptomatologie de la rage s'était produite. Or la rage à virus fixe n'avait pas été étudiée à ce point de vue par MM. van Gehuchten et Nelis; il était d'un intérêt capital de rechercher si, chez les animaux ayant présenté aussi des symptômes de paralysie, se retrouverait la lésion capsulaire, observée dans la rage des rues. M. le professeur Calmette voulut bien nous envoyer du virus fixe, qui fut inoculé soit par la voie subdurale, soit par d'autres voies (intra-oculaire, sous-cutanée, etc.) à une série d'animaux. Les recherches histologiques faites avec le plus grand soin, en suivant scrupuleusement la technique du laboratoire de Louvain, donnèrent des résultats pour ainsi dire complètement négatifs. Ces résultats furent communiqués à la Société médico-chirurgicale de Liége[1] le 5 avril 1900. Nous émettions l'opinion, d'accord avec MM. Firket

[1] *Le Scalpel*, Liége, 8 avril 1900.

et Malvoz, que, si intéressante que fût cette lésion de la rage des rues, elle n'était probablement pas la cause première des symptômes de la rage, mais il fallait la considérer comme une lésion de réparation ou de phagocytose consécutive à l'altération des cellules nerveuses et n'ayant pas le temps de se produire dans la rage exaltée des laboratoires.

M. van Gehuchten avait fait, de son côté, nous l'avons appris par un travail publié en mai 1900 dans le *Névraxe*, des inoculations de virus fixe : il reconnut que la lésion capsulaire n'existait avec quelque intensité que chez les animaux ayant succombé à la rage des rues, particulièrement chez le chien. La lésion ne se produit pas non plus quand on introduit chez les animaux le virus des rues par la voie subdurale.

Les lésions ganglionnaires ont été recherchées par de nombreux observateurs, non seulement chez les animaux morts de la rage des rues, mais chez les chiens en pleine infection rabique. M. Nocard, notamment, a vu que les altérations décrites par MM. van Gehuchten et Nelis n'existaient pas toujours chez le chien rabique en pleine évolution de la maladie : il semble que la lésion ne se produise avec quelque netteté que dans les dernières périodes de l'affection. Aussi faut-il, le plus possible, laisser la rage évoluer jusqu'à la mort chez les animaux pour avoir chance de constater la lésion, dont la présence a certes la plus grande importance pour le diagnostic pratique de la rage.

MM. van Gehuchten et Nelis ont eu le grand mérite non seulement de découvrir une lésion qui n'avait pas été signalée et de proposer une méthode de diagnostic qui, dans certaines conditions bien précisées aujourd'hui, rend de grands services, mais en outre d'avoir provoqué de nouvelles recherches sur la symptomatologie de la rage.

Nous avons dit déjà que la rage à virus fixe ne se caractérise pas par la lésion de van Gehuchten.

Nous avons fait de nombreuses tentatives dans l'espoir de trouver le moyen de transformer le virus fixe en un virus atténué, dont l'inoculation par l'une ou l'autre voie provoquerait une rage avec lésions capsulaires. Nos essais ont complètement échoué. Nous avons eu beau injecter tantôt des moelles à virus fixe plus ou moins longtemps desséchées, tantôt du virus fixe, mais après des vaccinations insuffisantes, et cela dans le but de

prolonger la période d'incubation : il ne nous a pas été possible, malgré la variété des voies d'introduction, d'obtenir les lésions capsulaires.

La reproduction de nos protocoles n'aurait guère d'intérêt. Voici seulement le cas d'un lapin qui fut d'abord soumis à des injections de moelles desséchées de virulences croissantes, puis, après un repos de 8 jours, reçut du bulbe virulent dans la chambre antérieure de l'œil. Il succomba à la rage, mais après 33 jours seulement, alors que le délai habituel dans la rage de laboratoire est de 10 à 12 jours. Les lésions ganglionnaires étaient pour ainsi dire nulles ; il n'existait même pas de tuméfaction des cellules endothéliales des capsules.

Il semble vraiment que les lésions capsulaires ne se rencontrent avec l'intensité signalée par MM. van Gehuchten et Nelis que dans la rage des rues et dans les conditions d'infection que réalisent les lésions particulières des morsures, toutes différentes de celles qu'on produit avec une seringue d'inoculation.

Mais s'il ne nous a pas été possible de produire expérimentalement la lésion van Gehuchten [1], nous avons pu retrouver cette dernière dans des pièces d'autopsie provenant du service de M. le professeur Firket, et dans un cas non rabique. Nous avons examiné systématiquement les ganglions du pneumogastrique des cadavres dans des cas de maladies infectieuses chroniques, notamment la tuberculose et la syphilis. Dans un cas de syphilis, les lésions se sont montrées très intenses et la multiplication des cellules endothéliales de la capsule du ganglion était aussi nette que dans la rage chez l'homme et le lapin.

1. Nous avons encore institué une série de recherches, dont le résultat malheureusement n'a pas répondu à notre attente, mais dont nous croyons devoir dire un mot pour indiquer dans quelle direction on pourrait peut-être trouver la solution de la question qui nous occupe, savoir la production expérimentale d'une lésion primitive des cellules nerveuses des ganglions, qui serait suivie d'une prolifération des cellules endothéliales de la capsule. De même que Delezenne a obtenu des sérums contre le système nerveux par des injections de substances nerveuses, de même nous avons traité des lapins par des émulsions de ganglions noueux et de ganglions spinaux du chien normal. Ces ganglions étaient broyés dans un mortier avec de l'eau salée physiologique et transformés en pulpe que l'on injectait sous la peau des lapins. Après 14 injections faites de 4 en 4 jours, on a recueilli le sérum du lapin et on l'a injecté au chien sous la peau et aussi dans le nerf sciatique. Il ne s'est rien produit, les chiens n'ont pas paru malades. Vraisemblablement la quantité d'anticorps formés n'était pas encore assez considérable pour amener la lésion des cellules nerveuses correspondant à celles qui avaient servi à l'immunisation.

Le malade était un syphilitique du service de l'hôpital des cliniques, ayant succombé à la suite de troubles variés. La syphilis datait de 2 ans; le malade présenta, dans les derniers mois de son existence, de la paralysie de certains muscles de la face et des membres inférieurs, paralysie à type intermittent. Il y avait aussi des troubles de la sensibilité (tactile, thermique et douloureuse). L'excitation directe des nerfs ne décélait pas de réaction de dégénérescence. Le neurone sensible était principalement altéré.

Le ganglion plexiforme du pneumogastrique a été fixé à l'alcool et enchâssé dans la paraffine. Les coupes ont été colorées par la méthode de Nissl, au bleu de méthylène : il est nécessaire de faire des coupes très minces pour éviter d'apercevoir, en coupe optique, plusieurs plans de cellules endothéliales, et d'être amené ainsi à croire à l'existence d'une prolifération de celles-ci qui n'existerait pas en réalité.

M. le docteur Albert Dubois a bien voulu exécuter de belles photographies de nos préparations. A un faible grossissement (fig. 1, pl. XIII) on reconnaît qu'il existe par places, à l'endroit occupé dans les ganglions normaux par des cellules nerveuses, des foyers de petites cellules rondes qui, à n'en pas douter, remplacent des cellules nerveuses. Mais l'examen à un fort grosissement est beaucoup plus intéressant. Les cellules nerveuses sont fort altérées ; on n'en voit pas qui aient conservé leur aspect normal. Nulle part on ne trouve comme dans les cellules normales, de blocs de chromatine ayant pris la matière colorante, ni même des grains de chromatine. La coloration de la cellule est uniforme. Le noyau très pâle est déplacé vers la périphérie dans un grand nombre de cellules.

La capsule péricellulaire est normale dans certains endroits ; en d'autres (fig. 2) on observe une prolifération très nette des cellules endothéliales qui se sont groupées en couches concentriques autour de la cellule nerveuse. Cette accumulation de nouvelles cellules constitue une véritable gaine qui est souvent plus épaisse en une partie de son pourtour. Certaines cellules ont conservé la forme allongée des cellules endothéliales, d'autres sont globuleuses.

Les vaisseaux présentent un léger degré d'endartérite : leur endothélium paraît légèrement tuméfié. Il n'y a pas d'amas leu-

cocytaires autour des vaisseaux (tubercules rabiques de Babes).

Pour apprécier ces lésions, incontestablement du type décrit par MM. Van Gehuchten et Nelis, il ne faut pas les comparer à celles du chien mort de rage naturelle, mais à celles de la rage des rues chez le lapin et chez l'homme, où les coupes ne diffèrent pas, le plus souvent, de celles de notre syphilitique.

M. Crocq a publié [1], de son côté, une observation fort intéressante de lésions capsulaires du ganglion noueux chez un enfant mort de croup.

En réalité, la production de ces lésions dans la rage et d'autres maladies infectieuses n'a rien de surprenant si on examine ces faits à la lumière des théories de M. Metchnikoff et de ses beaux travaux sur l'infection, sur l'atrophie et sur la résorption cellulaire. MM. Van Gehuchten et Nelis, tout au moins si l'on s'en rapporte à leurs publications, semblent avoir compris que le virus rabique frappait d'abord les cellules endothéliales de la capsule des cellules nerveuses pour amener secondairement la disparition de celles-ci. « La néoplasie rabique, écrivait Nelis dans son premier mémoire, a ceci de remarquable que les cellules de nouvelle formation commencent par entourer la cellule nerveuse et l'envahissent progressivement. Nous croyons que c'est là le point capital et pathognomonique de l'anatomie pathologique de la rage. »

Dans une conférence à la Société médico-chirurgicale d'Anvers le 9 avril 1900, M. Van Gehuchten disait de son côté : « Le virus rabique exerce une action spéciale sur les ganglions périphériques. Elle consiste dans une excitation spéciale que ce virus exerce sur les cellules endothéliales des capsules péricellulaires. Sous l'influence de cette excitation spéciale, ces cellules se mettent à se multiplier activement par voie directe, enveloppant et étouffant lentement la cellule nerveuse qu'elles avaient pour mission de protéger. »

Le savant maître de Louvain semble donc, si nous comprenons bien, envisager la lésion de la cellule nerveuse comme une lésion passive due à la compression des cellules nouvelles sur lesquelles le virus rabique concentrerait son action.

Cette interprétation ne correspond pas à l'opinion que l'on se fait aujourd'hui, en bactériologie, du mécanisme de l'action

1. *Journal de Neurologie,* 5 juillet 1900.

des microbes et toxines sur le système nerveux, ni non plus à la conception de Metchnikof de l'antagonisme cellulaire. Pour ce qui concerne particulièrement les toxines, on admet qu'elles agissent surtout sur les éléments nobles tels que les cellules nerveuses, et que ce n'est que secondairement que les tissus de soutien s'entreprennent : la toxine tétanique, en particulier, formerait même, d'après Ehrlich, une véritable combinaison avec certains chaînons du protoplasma des cellules nerveuses ; quant aux altérations histologiques qui succèdent à ces lésions des cellules nobles, Metchnikoff et ses élèves les considèrent comme se rattachant aux processus de phagocytose. A l'état de santé, les cellules nerveuses et leurs gaines enveloppantes, ainsi que les cellules de la névroglie, sont dans un état d'équilibre caractérisant justement l'état normal et permettant le fonctionnement intégral de la cellule noble. Mais dès que celle-ci est lésée, cet équilibre est rompu, les cellules de la névroglie, les cellules mobiles, d'autres cellules encore se mettent à proliférer, et leur activité s'exerce contre la cellule malade, laquelle, si la mort n'arrive pas trop vite, est plus ou moins tôt remplacée par des cellules plus petites. C'est le mécanisme de l'atrophie des ovules à l'état normal dans les ovaires des mammifères, d'après Matschinsky [1]; c'est ce qui se passe dans le sytème nerveux central, d'après Joukowski [2], à la suite de l'injection de toxine tétanique, quand la mort n'est pas trop rapide ; c'est ce que l'on voit encore dans l'intoxication botulinique étudiée par Ossipoff [3], au laboratoire de Metchnikoff.

Dans tous ces cas, on a pu assiter à une véritable lutte entre les cellules nerveuses touchées par la toxine, et des éléments phagocytaires du voisinage qui, dans certains cas, comme l'ont vu notamment Courmont et Doyon dans le tétanos expérimental [4], de même que Joukowky et Ossipoff, arrivent à remplacer complètement les cellules nerveuses intoxiquées.

Nous pensons, et cette interprétation avait déjà été indiquée par nous dans notre communication à la Société médico-chirurgicale de Liége du 5 avril 1900, avant que parussent les travaux précités, que la lésion de Van Gehuchten et Nelis s'ex-

1. *Annales Pasteur*, mars 1900.
2. *Annales Pasteur*, juillet 1900.
3. *Annales Pasteur*, décembre 1900.
4. *Journal de physiologie et de pathologie générale*, 15 juillet 1900.

plique par l'activité phagocytaire des cellules endothéliales, à la suite de l'altération vitale de la cellule nerveuse. Cette lésion s'observe surtout dans la rage des rues qui est le type des infections chroniques, mais elle n'est pas spécifique, même par sa localisation, puisque Crocq l'a vue dans un cas de croup et nous-même chez un syphilitique. Cette lésion doit être considérée comme de même nature, quoique plus accentuée à la vérité, que les altérations histologiques décrites dans les intoxications tétanique et botulinique.

EXPLICATION DE LA PLANCHE XIII

Fig. 1. — Coupe d'un ganglion plexiforme humain dans un cas de syphilis (faible grossissement). Zeiss, obj. B. ocul. apochromatique N° 4.

Fig. 2. — Coupe d'un ganglion plexiforme humain dans un cas de syphilis (fort grossissement). Lésions capsulaires autour des cellules nerveuses. Zeiss. obj. immersion homogène apochromatique.

ÉTUDES BIOLOGIQUES SUR LA VIEILLESSE

Par Élie METCHNIKOFF.

II

RECHERCHES SUR LA VIEILLESSE DES PERROQUETS

Par MM. METCHNIKOFF, MESNIL ET WEINBERG.

Avec la planche XIV.

Dans la première étude (ces *Annales*, 1901, p. 865), il a été possible d'établir que le blanchiment des cheveux et des poils est l'œuvre des cellules amiboïdes — *pigmentophages*, ou mieux encore, *chromophages*. Ces éléments, sous l'influence de causes non encore déterminées, se surexcitent et, à un moment donné, englobent les grains pigmentés des cheveux et des poils, pour les transporter soit dans la peau, soit en dehors de l'organisme. De cette façon, les cheveux et les poils blanchissent, souvent en un espace de temps très court.

Il est incontestable qu'il s'agit ici d'un phénomène capable de jeter une lumière sur la dégénérescence sénile en général. Seulement, pour vérifier cette conclusion, il est nécessaire d'entreprendre une longue série de recherches. Or. celles-ci sont entourées de difficultés considérables. Sans parler de ce que les autopsies humaines ne peuvent se faire que 24 heures après le décès, il est souvent très malaisé de se procurer de ces organes, même conservés dans de si mauvaises conditions. Il y a bien, parmi les animaux domestiques, des espèces qui peuvent servir à l'étude de la vieillesse ; mais, comme la plupart d'entre eux n'atteignent qu'un âge très peu avancé, on se demande si l'on a le droit de comparer leurs altérations séniles à celles de l'homme. Il est difficile de trouver des chevaux et des chiens ayant dépassé vingt ans. Il en est de même pour la volaille, telle que poules, canards, etc. Voilà pourquoi l'étude des vieux perroquets présente un intérêt très grand, ces oiseaux étant capables de vivre aussi longtemps que l'homme.

On pense généralement que les perroquets, même en captivité, peuvent atteindre un âge très avancé. Cette opinion s'est surtout répandue à la suite d'un récit d'*A. von Humboldt* d'un vieux perroquet qui parlait la langue des Atures, tribu américaine éteinte. Ce perroquet, ayant survécu aux derniers représentants de ces Indiens, ne pouvait être compris par personne. Cette légende a inspiré des poètes, mais il est difficile d'en tirer quelque résultat sérieux au point de vue scientifique.

Le grand connaisseur des oiseaux, *Naumann* [1], affirme d'une façon générale que les perroquets, « atteignent en captivité l'âge de 100 ans et plus. » *Brehm* [2] s'exprime d'une façon plus vague et se contente de la remarque que les perroquets « vivent longtemps ».

Le Vaillant [2] rapporte l'histoire d'un perroquet cendré, ou Jaco (*Psittacus erythraceus*), mort à 93 ans. Déjà, à 60 ans, il a commencé par perdre la mémoire ; à 90 ans, il est devenu aveugle et, dans les deux dernières années de sa vie, il lui était impossible de percher, et il ne pouvait que se tenir debout sur le sol. A la fin, il devint incapable de prendre la nourriture, et on dut la lui donner. La mue est devenue irrégulière, à partir de 65 ans.

Gurney [3], qui a réuni le plus grand nombre de renseignements sur la longévité des perroquets, ne considère pas le récit de *Le Vaillant* comme bien prouvé. Il dit que ce sont les cacatois, notamment ceux à crête jaune, qui atteignent l'âge le plus avancé parmi les perroquets. Il cite un cas absolument véridique où un individu de ce genre a vécu 81 ans. Dans les autres exemples, recueillis par *Gurney*, la longévité a oscillé de 15 à 80 ans. Les *Chrysotis Amazonica* sur lesquels il a pu avoir des renseignements précis ne vécurent que 24 et 30 ans.

C'est sur des individus de cette dernière espèce que nous avons pu faire nos recherches. Nous possédons en ce moment un Chrysotis qui, d'après les renseignements fournis, doit avoir de 70 à 72 ans. L'âge n'a servi qu'à changer son humeur qui est devenue méchante. Autrement, le perroquet a l'air bien portant ;

1. *Die Vogel Deutschlands*, p. 125.
2. *Les Oiseaux*, t. I, p. II.
3. *Histoire naturelle des perroquets.*
4. *On the comparative age to which Birds live. The Ibis*, January 1899, 7e série, vol. V, n° 17, p. 19

son plumage est brillant et coloré d'une façon normale : c'est un mâle, dont l'appétit sexuel s'est bien conservé jusqu'à présent.

Un autre individu de la même espèce (*C. Amazonica*) nous est parvenu peu de temps après sa mort, au printemps de 1901. Le cadavre nous a été gracieusement donné par une dame qui avait acheté le perroquet, en 1871, à un marchand de vin à Paris. Celui-ci le possédait depuis plusieurs années, et le tenait d'une demoiselle qui l'avait gardé 28 ans, l'ayant hérité d'une vieille dame chez laquelle elle était restée comme demoiselle de compagnie 22 ans, pendant lesquels elle avait toujours vu ce perroquet. De sorte que cela donnerait un total de 81 ans, sans compter les années passées chez le marchand de vin, et celles chez la première propriétaire, avant l'arrivée de la demoiselle de compagnie.

Les dernières années de sa vie, le perroquet manifestait des signes évidents de sénilité et de faiblesse. Le plumage était devenu rare, ayant toutefois conservé sa coloration naturelle. Quelques jours avant sa mort, le Chrysotis ne se nourrissait plus que d'un peu de riz cuit, et, contrairement à son habitude, buvait continuellement. Il est mort pendant la nuit, lors d'un abaissement de température survenu en avril 1901.

A l'autopsie, le perroquet se présenta comme femelle, avec un ovaire dont les follicules ne contenaient qu'un tissu conjonctif lâche.

L'examen microscopique des organes ne révéla aucune anomalie particulière, ni aucun signe de maladie aiguë, à laquelle on pourrait attribuer la mort de l'animal. L'étude microscopique du foie, traité par la liqueur de *Flemming*, démontra l'accumulation partielle de granulations graisseuses dans les cellules hépatiques. Par contre, il ne s'est présenté aucun phénomène indiquant des processus cirrhotiques. Les vaisseaux du foie, remplis de sang, ne manifestaient aucun symptôme anormal, et les cellules endothéliales présentaient leurs caractères habituels.

La rate, gorgée de sang, laissait percevoir des foyers de tissu lymphoïde, dans lequel nous n'avons pu trouver de signes de prolification. Les cellules, mononucléaires, se distinguaient par leur pauvreté en protoplasma et par la variabilité du noyau. Celui-ci était le plus souvent très riche en chromatine ; les cel-

lules plus âgées renfermaient un noyau dilaté par la grande quantité de suc nucléaire. Dans quelques cellules, le noyau était divisé en fragments, ce qui correspond plutôt à une variété de karyolyse qu'à une véritable karyokinèse. Le tissu intermédiaire ne s'est montré nullement épaissi.

Les reins se sont présentés également dépourvus de phénomènes d'augmentation de tissu conjonctif. La sclérose rénale faisait certainement défaut, chez notre vieux perroquet. Les glomérules étaient normaux et les tubes ne présentaient qu'une certaine lâcheté des cellules épithéliales qui les constituent, fait attribuable aux conditions de conservation des organes. La dégénérescence graisseuse de l'épithélium rénal était prononcée au même titre que dans le foie.

Les muscles et le cœur ne présentaient rien de particulier.

C'est le système nerveux central qui a surtout attiré notre attention, par des phénomènes très curieux dans le cerveau. Tandis que la moelle et le cervelet ne présentaient rien d'anormal, le cerveau était rempli de cellules mononucléaires, remplissant le rôle de macrophages. Les éléments nerveux se distinguaient par l'absence de dépôts de pigment, si abondants dans les centres nerveux des vieillards et des vieux mammifères (chien, cheval). Les corpuscules de *Nissl* étaient disposés d'une façon assez irrégulière, fait commun aux perroquets jeunes.

Malgré l'absence de symptômes dégénératifs des cellules nerveuses, un très grand nombre d'entre elles étaient entourées de *neuronophages*, ou cellules mononucléaires à noyau rond et, le plus souvent, riche en chromatine.

Les phénomènes de neuronophagie sont bien connus dans l'histologie pathologique des centres nerveux. On les rencontre dans un bon nombre de maladies nerveuses et d'intoxications. Ils sont très fréquents aussi dans le cerveau des vieillards et des vieux mammifères, comme l'à énoncé pour la première fois *Pugnat* [1]. Mais jamais nous n'avons observé de neuronophagie comparable à celle de notre vieux perroquet. Des régions entières de l'écorce cérébrale étaient remplies d'amas de neuronophages (fig. 5), au milieu desquels on ne trouvait plus de cellules nerveuses. Ces amas étaient constitués par un nombre variable, jusqu'à 20 et plus, de neuronophages, caractérisés par le noyau

1. *Comptes rendus de la Société de biologie*, 1898, p. 242.

qui se colorait fortement par les couleurs basiques d'aniline et par le protoplasma incolore. Ce dernier se présentait donc comme une zone claire autour du noyau.

Tous les stades intermédiaires entre la présence de la cellule nerveuse typique (*fig.* 4,7) et sa disparition complète (*fig.* 5) ne laissaient aucun doute qu'il s'agissait véritablement d'une phagocytose intense. L'ensemble des phénomènes que nous avons pu saisir indique que cette phagocytose consiste en un passage progressif du contenu de la cellule nerveuse dans l'intérieur des neuronophages environnants. Ceux-ci n'englobent pas l'élément nerveux entier dans son intégrité, mais, pour ainsi dire, le sucent, à la façon des Acinétiens en train d'ingérer le contenu de leur proie.

Les perroquets jeunes de la même espèce (*Chrysotis Amazonica*) que nous avons étudiés à titre de témoins, ne présentaient jamais de phénomènes de neuronophagie aussi intenses. On pouvait retrouver chez eux aussi (*fig.* 1) des neuronophages avoisinant les cellules ganglionnaires, mais il y avait loin de là à ce degré de neuronophagie que nous avons observée chez le vieux *Chrysotis*. D'un autre côté, il est à remarquer que chez le jeune perroquet il s'est trouvé des cellules nerveuses, réunies par groupes (*fig.* 1, a), ce qui pourrait donner lieu à une confusion avec les neuronophages.

Des phénomènes comparables à ceux du vieux perroquet se sont présentés à nous pendant l'étude des modifications histologiques d'une petite perruche (*Palæornis torquata*), morte à sa vingtième année. Chez celle-ci également, l'écorce cérébrale était remplie soit de cellules nerveuses de tous côtés entourées de neuronophages, soit d'amas de ces derniers, au milieu desquels on ne pouvait plus retrouver la cellule nerveuse atrophiée.

La question de cette perruche se complique, à cause de l'incertitude au sujet de sa mort. Peut-on l'attribuer à la vieillesse de l'animal, ou bien a-t-elle été due à quelque empoisonnement indéterminé? L'âge de vingt ans serait peut-être déjà très avancé pour un si petit représentant de la famille des perroquets. Seulement, contre cette hypothèse, il y a à signaler que la perruche ne semblait nullement vieillie; elle volait comme d'habitude, et ni les mouvements, ni l'appétit, ni la mémoire,

ni aucune fonction vitale en général ne présentaient de symptômes de dégénérescence. Il y aurait plutôt lieu de supposer l'effet toxique de quelque aliment, car la neuronophagie pourrait bien en résulter tout aussi bien qu'à la suite de la dégénérescence sénile, qui, elle aussi, doit être considérée comme la conséquence d'un empoisonnement chronique.

Il serait très important d'être en possession d'un plus grand nombre de vieux perroquets, afin d'obtenir des résultats plus complets. Mais, vu la rareté du matériel, nous nous décidons à publier nos observations dans leur état actuel, d'autant plus qu'elles sont en pleine harmonie avec nos recherches sur la vieillesse des mammifères qui feront l'objet d'un prochain mémoire.

EXPLICATION DES FIGURES DE LA PL. XIV.

FIG. 1. Cellules nerveuses du jeune perroquet, dont plusieurs sont entourées de neuronophages, — *a*, deux cellules nerveuses jumelles.

FIG. 2, 3, 4. Cellules nerveuses de l'écorce cérébrale du vieux perroquet. en train d'être dévorées par les neuronophages.

FIG. 5. Partie d'une coupe de l'écorce cérébrale du même perroquet avec plusieurs cellules nerveuses en train d'atrophie par voie de neuronophagie

FIG. 6. Débris d'une cellule nerveuse du même perroquet, entourés de neuronophages.

FIG. 7. Une autre cellule cérébrale du même animal. de tous côtés entourée de neuronophages.

DE L'IMMUNISATION ACTIVE CONTRE LA PESTE

LE CHOLÉRA ET L'INFECTION TYPHIQUE

PAR LE Dr BESREDKA.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Dans la note présentée le 2 juin à l'Académie des Sciences [1], nous avons résumé aussi brièvement que possible nos expériences sur un nouveau procédé d'immunisation contre la peste, le choléra et l'infection typhique. Le présent mémoire a pour objet d'exposer avec plus de détails ces expériences et de les compléter par un certain nombre d'autres faites depuis.

Il existe à l'heure actuelle deux moyens principaux de préserver les animaux contre les maladies infectieuses : l'un consiste à injecter des anticorps spécifiques, l'autre consiste à injecter les microbes mêmes (cultures tuées ou atténuées) contre lesquels on cherche à se protéger.

Par le premier procédé on réalise une immunisation passive, par le second — une immunisation active.

Nous devons signaler en plus le procédé mixte qui consiste à injecter le mélange de sérum et de microbes; c'est celui que M. Leclainche a proposé contre le rouget du porc, et MM. Calmette et Salimbeni contre la peste; nous y reviendrons plus bas.

L'immunisation passive ainsi que l'immunisation active présentent chacune ses avantages et ses défauts : résumons-les très rapidement.

Rien n'égale, au point de vue de l'efficacité et surtout de la rapidité de l'action préventive, les sérums spécifiques. Déjà 24 heures après l'injection et même plus tôt, l'immunité est certaine. L'opération est presque indolore et ne s'accompagne généralement d'aucun phénomène général, ni local. On aurait là un moyen préventif idéal, si l'immunité conférée par le sérum n'était pas de si courte durée; car, à peine 15 jours sont-ils expirés depuis l'injection, que l'immunité est déjà disparue ou peu s'en faut.

1. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 2 juin 1902, p. 1330.

De nombreuses expériences sur les animaux de laboratoire, ainsi que les observations sur l'homme en temps d'épidémie, ont montré qu'après un délai de 15 jours, il ne faut plus compter sur l'action préventive du sérum, et il est tout indiqué, pour se mettre à l'abri de l'infection, de renouveler l'injection.

Bref, l'immunité par le sérum est certaine, rapide, inoffensive, mais très passagère.

* * *

L'immunisation par des corps microbiens a été pratiquée sur une vaste échelle, surtout dans les pays où la peste et le choléra sont à l'état endémique et où l'on cherche à obtenir une immunité d'aussi longue durée que possible.

Chez les animaux de laboratoire, ainsi que chez l'homme, l'immunité, dans ce cas, se montre relativement très solide, surtout pour ce qui concerne la peste. Il est difficile de déterminer avec précision sa durée, car celle-ci varie avec l'espèce animale, avec le mode d'inoculation, avec la quantité de microbes injectés, enfin, avec l'état même des microbes; toujours est-il que cette méthode d'immunisation est très supérieure à celle avec du sérum, car l'immunité peut durer dans ce cas 3, 5, 6 mois et, peut-être même, plus longtemps: elle peut donc rendre des services des plus importants en cas d'épidémie.

Mais, à côté de cet avantage que presque personne ne conteste plus aujourd'hui, la méthode en question — la méthode de M. Haffkine — présente certains inconvénients, assez sérieux pour rendre son application souvent inopportune.

Lorsqu'on injecte à un animal des microbes tués, en vue de l'immunisation, que cela soit sous la peau ou dans le péritoine, il s'écoule toujours un certain temps avant que l'animal acquière un degré d'immunité suffisant pour résister à une infection mortelle. Cette période d'incubation dure de 8 à 12 jours, d'après la plupart des expérimentateurs; et, pendant tout ce temps, l'animal est à la merci de l'infection, tout comme un animal non vacciné.

Ce n'est pas tout.

D'après les expériences de MM. Calmette et Salimbeni, un animal qui est vacciné contre la peste par des cultures chauf-

fées, se trouve, pendant tout le temps qu'il prépare son immunité, en état d'infériorité manifeste vis-à-vis de la peste, par comparaison avec le témoin, non vacciné.

Ainsi, ces savants ont vu que les souris qui étaient en voie d'immunisation, succombaient à des doses de microbes pesteux, non mortelles pour les souris normales. Il est donc certain, disent les auteurs, « qu'après les injections de cultures chauffées et jusqu'à ce que l'immunité que confèrent celles-ci soit complète, c'est-à-dire pendant 8 à 10 jours après l'injection vaccinale, l'organisme se trouve momentanément sensibilisé à l'égard d'une infection, même très légère ».

Cette sensibilité exagérée de l'individu dans le cas de peste, par exemple, n'a rien de surprenant, si l'on songe que le vaccin lui-même, la lymphe de Haffkine, est toxique, et que son injection est suivie, chez l'homme, des troubles à la fois généraux et locaux.

Déjà quelques heures après l'injection, la température monte au-dessus de la normale pour atteindre 38°-39° et même 40°-40°,5. Cet état fébrile persiste pendant 15 à 48 heures. L'individu est pris de malaise général, d'abattement, de céphalalgie. Au niveau de l'inoculation, la région est rouge, tuméfiée et douloureuse; on observe quelquefois la formation d'abcès; souvent, les ganglions correspondants sont engorgés et douloureux; dans certains cas, il y a de la tuméfaction douloureuse des bourses.

Ce n'est qu'au bout de 3 à 5 jours que tout rentre généralement dans l'ordre.

Si peu prononcées que soient les suites de la vaccination, on conçoit qu'en plein foyer d'épidémie ces symptômes qui, en plus, simulent la peste au début, ne peuvent laisser que d'être parfois très inquiétants[1].

En résumé, la vaccination par les microbes chauffés confère une immunité durable; celle-ci ne s'établit pas avant 8 à 12 jours, pendant lesquels la résistance naturelle de l'individu est affaiblie; l'injection est généralement accompagnée de troubles généraux et locaux.

1. Consulter : *Les Épidémies de peste en Extrême-Orient*, par MM. Simond et Yersin, *Congrès international de Médecine*, Paris, 1900. Sous-section coloniale; — *Reports and Papers on bubonic plague*, by Bruce Low, London, 1902; — *Sur le traitement de la peste* (en russe) *Wratch*, 1902, par M. Kaschkadamoff.

* * *

Pour remédier aux inconvénients de l'immunisation par les microbes chauffés, MM. Calmette et Salimbeni ont pensé à employer le mélange de sérum et de microbes. Cette méthode pourra certainement rendre des services, car, tout en mettant le vacciné à l'abri de fâcheuses conséquences dues aux cultures chauffées, elle pourra lui assurer une immunité plus stable que ne peut le faire le sérum seul. Des expériences sur des souris faites dans cet ordre d'idées, nous permettent de l'affirmer, mais elles nous ont aussi montré que l'immunité acquise dans ces conditions, tout en étant supérieure à celle conférée par le sérum seul, n'est pas de longue durée ; tout au plus si après 7 à 8 semaines on peut encore constater l'état réfractaire chez les souris ainsi immunisées, alors que l'immunité peut persister 4, 5, 6 mois quand les bacilles sont injectés seuls.

Nous nous sommes alors demandé si, en réduisant la quantité de sérum au strict minimum, on n'arriverait pas à éliminer son action défavorable, tout en utilisant, en partie au moins, ses propriétés spécifiques si précieuses.

Nous savons, depuis les expériences de MM. Ehrlich et Morgenroth, que toute cellule mise en contact avec son anticorps, fixe celui-ci, et cela à l'exclusion de toute autre substance qui pourrait s'y trouver mélangée. En laissant aux microbes la liberté de prendre la quantité d'anticorps qu'ils peuvent fixer et en enlevant le reste du sérum, nous avons cru pouvoir réaliser de la sorte le minimum du sérum voulu.

Ce sont des microbes ainsi préparés que nous avons employés pour immuniser les animaux.

Avant de passer à la description de la technique adoptée, nous voudrions ajouter encore quelques mots au sujet de cette action empêchante et paradoxale, au premier abord, du sérum sur la production de l'immunité.

Cette idée, nous l'avons trouvée nettement exprimée dans un travail soigneusement fait de M. Beinarowitsch, paru en 1898[1].

Cet auteur s'est proposé d'étudier la valeur de l'immunité, dans les cas où l'on combine l'effet du sérum antipesteux avec les bacilles pesteux vivants ; il est arrivé à cette conclusion que « l'aptitude d'élaborer l'immunité active et la durée de cette

1. *Archives des Sciences biologiques*, t. VI, fasc. 3, 1898.

dernière sont en raison inverse de la quantité de sérum injecté avant l'inoculation des bacilles ».

L'auteur se borna à faire cette constatation si curieuse, sans y insister autrement.

Tout récemment, M. R. Pfeiffer et Friedberger[1], travaillant dans une direction toute différente, ont apporté une preuve indirecte à l'appui de l'action empêchante du sérum.

Ils ont injecté à une série d'animaux une dose de vibrions cholériques capable de faire paraître dans leur sérum des anticorps; à d'autres animaux ils ont injecté les mêmes doses de vibrions, en ajoutant en plus des quantités croissantes de sérum anticholérique. *Or*, ils ont constaté que, plus ils ajoutaient du sérum spécifique, moins bien ces animaux élaboraient des anticorps et, à un certain moment, ils n'en élaboraient plus du tout, bien que la dose de vibrions injectés fût restée toujours la même.

De l'ensemble de ces expériences, il ressort donc avec évidence que le sérum exerce une influence nuisible au point de vue de la production de l'immunité, et, lorsqu'il se trouve en excès, les microbes injectés en même temps que lui traversent l'organisme sans que l'animal en garde le moindre souvenir.

***

C'est en nous inspirant de cette idée que nous avons cru utile de mettre à profit la découverte de MM. Ehrlich et Morgenroth, mentionnée plus haut, et d'employer des microbes avec aussi peu d'anticorps que possible.

Voici la technique que nous avons adoptée.

Nous nous servons de cultures de 48 heures sur gélose; les microbes râclés de la surface de celle-ci, sont émulsionnés dans très peu d'eau physiologique.

Lorsqu'il s'agit de bacilles pesteux, on commence par chauffer l'émulsion au bain-marie à 60° pendant 1 heure, ce qui suffit pour tuer sûrement tous les microbes. L'émulsion, devenue visqueuse, est versée le long des parois dans un vase cylindrique contenant du sérum antipesteux, bien agglutinant. Il se forme deux colonnes superposées et bien délimitées : les microbes en haut, le sérum en bas. Les microbes qui occupent la couche inférieure de la colonne et qui baignent dans le sérum, au bout de quelque temps, se réunissent en amas floconneux de plus en

1. *Berliner, Klin. Wochenschrift*, 1902, n° 25.

plus gros, et finissent par tomber au fond du tube; peu à peu, tous les microbes subissent le même sort, de sorte qu'au bout de 12 heures, ils se trouvent tous entassés dans la partie inférieure du tube, et le liquide surnageant devient complètement limpide.

Ce dernier est décanté; le dépôt microbien est soigneusement lavé à la turbine plusieurs fois dans l'eau physiologique jusqu'à la disparition de dernières traces de sérum. La masse ainsi obtenue est de consistance pâteuse, demi-liquide, blanche, et donne, après addition d'eau physiologique, une émulsion fine et tout à fait homogène.

C'est cette masse que nous injectons pour conférer à l'animal l'immunité active et que nous désignons sous le nom de *vaccin antipesteux*.

Les vaccins *anticholérique* et *antityphique* sont préparés de la même façon, avec cette différence que les corps microbiens sont traités par leurs sérums respectifs avant de subir le chauffage au bain-marie, ce qui leur permet de fixer mieux la substance spécifique du sérum [1]; on les soumet ensuite aux lavages à la turbine, et, lorsque tout le sérum est complètement chassé, on les porte à la température de 56° pendant une heure.

Il ne sera pas inutile, peut-être, d'ajouter quelques détails en plus, pour ce qui concerne la pratique de préparation de ces vaccins. Les sérums que nous employons à cet effet doivent être bien agglutinants: cette remarque s'applique notamment au sérum antipesteux qui, malgré un pouvoir préventif et même antitoxique très prononcé, peut n'être que très faiblement agglutinant ou ne pas l'être du tout. On conçoit que, dans ce cas, les microbes restent en suspension dans le liquide et ne se prêtent pas aux manipulations nécessaires. Nous préférons pour cela nous servir de sérum non chauffé.

Autre détail : les microbes doivent être complètement débarrassés du sérum dans lequel ils baignent, et cela pour les raisons que nous avons exposées plus haut au sujet de l'influence défavorable du sérum; mais il faut se garder de tomber dans l'autre extrême et de laisser macérer les microbes longtemps dans l'eau physiologique, où ils perdraient une partie de la

1. Si nous commençons par chauffer les bacilles pesteux avant de les traiter par leur sérum, c'est simplement par mesure de précaution, pour ne pas avoir à manipuler des bacilles vivants.

substance active. Les lavages des microbes doivent se succéder rapidement, de façon que toute l'opération soit terminée le même jour; il faut, bien entendu, opérer dans des conditions d'asepsie absolue. Lorsqu'on n'est pas sûr de la stérilité des vaccins ainsi préparés, on peut les chauffer de nouveau sans inconvénient à 56° pendant 1/2 à 1 heure.

*
* *

Le vaccin antipesteux préparé d'après le procédé indiqué est dépourvu de toute action toxique.

On sait que les cultures de bacilles pesteux conservent leur toxicité même après avoir été tuées par la chaleur; ainsi, la lymphe de Haffkine (culture en bouillon chauffée à 70°) tue les souris à la dose de 1/10 c. c. environ, d'après les données de MM. Wurtz et Bourges[1]; d'après nos propres expériences, les cultures sur gélose ne sont pas moins toxiques : 1/10-1/15 de culture de 48 heures tue la souris dans les 24 heures avec des phénomènes d'intoxication ; à des doses inférieures à la mortelle, les souris sont manifestement malades. Or, notre vaccin antipesteux, même à des doses 20-30 fois supérieures à celle que nous venons d'indiquer, est très bien supportée par les souris; ainsi, nous avons injecté à des souris sous la peau du dos le contenu de 2 *tubes* de gélose de vaccin antipesteux sans provoquer aucun phénomène morbide, appréciable à l'œil.

Il est donc certain qu'à la suite du traitement qu'il a subi, le bacille pesteux a perdu son pouvoir toxique pour l'animal.

Étant donnée la non-toxicité du vaccin antipesteux pour les souris, on comprend que l'injection de ce dernier à l'homme ne doit pas être suivie de troubles généraux, comme c'est le cas pour la lymphe de Haffkine.

La seule observation que nous possédons à ce sujet est celle que nous avons faite sur nous-même. Au mois de mai 1902, nous nous sommes fait injecter sous la peau du flanc une quantité de vaccin qui est équivalente à deux doses de lymphe de Haffkine[2].

1. *Archives de médecine expérimentale*, 1902, p, 145.
2. A l'Institut Pasteur, au lieu du procédé classique de M. Haffkine, on se sert de cultures sur gélose émulsionnées dans l'eau physiologique; 1 c. c. de cette émulsion correspond à 1 dose de lymphe de Haffkine pour un adulte; la dose que nous nous sommes injectée était égale à 2 c. c. de cette émulsion.

Quelques heures après, nous avons éprouvé au niveau de l'inoculation une douleur qui avait à peu près disparu le lendemain; la nuit le sommeil était agité, bien que la température n'ait pas dépassé 37°,7.

Ce fut tout. Ni le jour de l'inoculation, ni le lendemain, nous n'avons cessé de vaquer à nos occupations ordinaires au laboratoire.

Localement, sauf la douleur, à aucun moment, il n'y a eu la moindre trace de tuméfaction, ni de rougeur.

***

Si la bénignité de la réaction générale dans le cas cité doit être attribuée à la non-toxicité du vaccin, l'absence de la réaction locale est due, très probablement, à la présence du fixateur dans les bacilles injectés. Qu'il s'agisse de cellules (hématies, spermatozoïdes, etc.), ou de microbes, dès qu'ils sont chargés de la substance fixatrice, ils deviennent presque instantanément la proie des phagocytes, alors que, dans les conditions normales, ces mêmes éléments auraient demandé des heures et des jours pour être complètement phagocytés.

Le rôle du fixateur dans les phénomènes de résorption est surtout manifeste lorsqu'on fait simultanément des injections des vaccins et des cultures ordinaires correspondantes.

Ainsi, il nous était impossible de faire à un lapin, par exemple, une injection sous-cutanée de vibrions cholériques tués, sans qu'il s'ensuivit une réaction inflammatoire avec formation d'abcès suppurants et n'ayant aucune tendance à se fermer. Il en était de même pour les bacilles typhiques morts, injectés sous la peau du cobaye ou du lapin.

Or, les mêmes microbes, injectés aux mêmes doses et aux mêmes animaux en un point du corps différent, ne déterminaient jamais la moindre induration, ni abcès, s'ils avaient été préalablement chargés de fixateurs.

***

Il nous reste à examiner les deux questions les plus importantes : 1° à quel moment apparaît l'immunité après l'injection des vaccins en question; 2° cette immunité une fois établie, combien de temps peut-elle durer.

Le moment auquel les animaux vaccinés deviennent réfractaires à l'infection, varie selon la nature de celle-ci et, probablement, selon l'espèce animale. Dans le cas de la peste, les souris[1] devenaient réfractaires à l'inoculation du virus à la patte, 48 heures après l'injection du vaccin antipesteux; les vaccins anticholérique et antityphique conféraient l'immunité aux cobayes déjà après 24 heures.

Il était intéressant de savoir comment les souris se comportaient vis-à-vis du virus pesteux dans les 48 heures qui précèdent l'apparition de l'immunité; à cet effet, après avoir injecté à une série de souris du vaccin antipesteux, on les a inoculées 6, 12, 24, 36 heures après. Toutes ces souris sont mortes, cela va de soi, mais toujours avec un retard de 3, 4, 8 jours sur le témoin.

Ce fait mérite d'être opposé aux expériences, citées plus haut, de MM. Calmette et Salimbeni, d'après lesquelles les souris vaccinées d'après le procédé Haffkine succombent déjà aux doses qui n'étaient pas mortelles pour les souris témoins.

* * *

Comme nous l'avons déjà fait remarquer, après l'injection du vaccin anticholérique ou antityphique, l'immunité vis-à-vis des microbes correspondants s'établit encore plus vite que dans le cas de la peste.

Déjà dès le lendemain, le cobaye est immunisé contre la dose qui tue le témoin dans les 24 heures.

1. La grande partie de nos expériences sur la peste ont été faites sur des souris blanches; ces animaux sont très commodes à cause de leur extrême sensibilité et de la facilité avec laquelle on les manie, ce qui n'est pas à dédaigner dans les recherches sur la peste. Mais l'inconvénient est qu'il est impossible de doser exactement le virus introduit par piqûre, et il arrive souvent que deux souris vaccinées dans des conditions identiques, se comportent différemment à l'inoculation du virus. Sur un total de 120-130 souris nous avons eu 25 0/0-30 0/0 de mortalité, bien que toujours avec une survie de plusieurs jours sur le témoin qui succombaient invariablement dans les 36-40 heures.

Dans les expériences de MM. Wurtz et Bourges, faites avec la lymphe de Haffkine aussi sur les souris blanches, mais dans des conditions un peu différentes des nôtres, la mortalité était de 72 0/0. Cela s'observe du reste aussi lors des essais de sérums antipesteux; des sérums notoirement actifs ne parviennent quelquefois à sauver qu'une souris sur deux à la dose de 1/4 c. c., alors que le même sérum, à un autre moment, ou un sérum moins actif, préserve les souris à la dose de 1/10 c. c.

Toutes nos expériences sur le virus pesteux vivant ont été faites dans le laboratoire aménagé à cet effet à l'Institut Pasteur. A mon ami, le Dr Dujardin-Beaumetz, chargé de ce laboratoire, j'exprime ma profonde reconnaissance pour son concours toujours très bienveillant.

Le vibrion cholérique qui nous a servi, tuait à la dose de 1/10 de culture sur gélose, en injection intrapéritonéale ; le bacille typhique tuait dans les mêmes conditions à la dose de 1/6-1/5 de culture de 24 heures.

Or, les deux vaccins — anti-cholérique et anti-typhique — injectés *sous la peau* à la dose d'une culture environ (l'effet aurait été peut-être le même, si l'on en avait injecté moins), préservaient sûrement dès le lendemain contre la dose mortelle injectée *dans le péritoine*, alors que les cobayes témoins qui, au lieu de vaccins, recevaient dans les mêmes conditions des cultures simplement chauffées de choléra ou de b. typhiques, succombaient dans les 24 heures, aussi bien que les cobayes neufs.

Contrairement à ce que nous avons observé sur des souris inoculées de peste, les cobayes qui avaient été vaccinés contre le choléra ou le b. typhique, d'après le procédé indiqué, survivaient tous à l'inoculation, sans exception, ce qui s'explique très probablement par la facilité avec laquelle on pouvait doser le virus dans ces cas et l'impossibilité de le faire dans le cas de peste chez les souris.



Comment expliquer cette apparition précoce de l'immunité dans ces trois maladies ?

Deux suppositions sont possibles : on peut admettre que le fixateur véhiculé par les corps microbiens devient libre dans l'organisme et agit dès lors comme agirait un sérum préventif, c'est-à-dire qu'il favoriserait la phagocytose du virus introduit ultérieurement lors de l'inoculation de bacilles vivants ; il assurerait de la sorte l'immunité de l'animal le premier temps, pendant que celui-ci est occupé à se créer une immunité active.

Si cette hypothèse répondait à la réalité, on ne comprendrait pas pourquoi il eût fallu dans le cas de la peste, par exemple, attendre 48 heures pour que le fixateur manifestât son action préventive ; cette action ne devrait-elle pas, en ce cas, être d'autant plus nette que l'on serait plus près du moment de l'injection du vaccin ?

Nous sommes plus enclin à adopter une autre hypothèse, plus conforme aux faits ; d'après cette hypothèse, le fixateur n'aurait d'autre fonction que d'exalter et d'activer le travail de

phagocytes (Sawtchenko) de façon à leur faire accomplir la besogne intra-cellulaire en moins de temps qu'ils ne le font pour les microbes ordinaires, soit en absence de fixateur; le temps nécessaire pour faire naître l'immunité active se trouverait de la sorte notablement abrégé. Il va sans dire que cette apparition rapide de l'immunité active ne doit pas forcément entraîner aussi l'apparition rapide des anticorps chez l'animal vacciné.

* * *

Quelle est la durée de l'immunité que confèrent nos vaccins? Il est impossible de donner une formule unique, s'appliquant à tous les cas; la dose de vaccin, sa nature, le point d'inoculation, l'espèce animale sont autant de facteurs qui obligent à individualiser les cas.

Ainsi, chez les cobayes vaccinés contre la peste, par la voie sous-cutanée ou intra-péritonéale, soit par le procédé de M. Haffkine, soit par le nôtre, il est impossible d'obtenir une immunité dépassant un mois et demi.

Après avoir été vaccinés par un de ces procédés, les cobayes résistent généralement à l'inoculation du virus pesteux pendant un mois; après 6 semaines, la survie est exceptionnelle, et, sous ce rapport, les deux procédés se valent complètement.

Il en est autrement chez les souris.

En commençant ces recherches, nous n'avions espéré, en chargeant les bacilles du minimum d'anticorps, que pouvoir prolonger l'immunité un peu au-delà de ce que peut donner le sérum seul. Étant donné l'innocuité des vaccins en question et certains avantagesque ceux-ci présentent sur la lymphe Haffkine, le résultat nous a paru tout à fait satisfaisant quand nous avons vu l'immunité persister encore deux mois après la vaccination.

C'est à ce moment-là que nous avons fait notre communication à l'Académie des Sciences, croyant que nous avions touché là presque à la limite de l'immunité possible. Désireux de déterminer cette limite avec précision, nous avons continué à éprouver l'immunité des souris vaccinées depuis plus de deux mois, en en essayant une ou deux tous les 8 jours. A notre grand étonnement, nous finîmes par constater que nous étions bien

au-dessous de la vérité en évaluant la durée de l'immunité à 2 mois : des souris vaccinées depuis 4 mois, 5 mois, 5 mois 1/2 ont résisté à l'inoculation du virus pesteux, auquel les souris témoins succombaient, comme d'habitude, en 36-40 heures.

Malheureusement, notre provision de souris, ayant été vaccinée depuis si longtemps, est actuellement épuisée, de sorte que pour le moment, nous sommes obligé de nous arrêter au chiffre de 5 mois 1/2, comme limite atteinte; peut-être cette limite pourra-t-elle être dépassée; les expériences ultérieures le montreront; toujours est-il que, déjà dès maintenant, la durée de l'immunité obtenue par le vaccin antipesteux, se trouve être aussi solide que celle que l'on obtient avec la lymphe de M. Haffkine [1].

Quant aux vaccins anticholérique et antityphique, la durée maximum de l'immunité que nous avons pu constater était de 5 mois environ, mais il est fort probable que l'immunité persiste au-delà de cette période. Il nous a été impossible de pousser plus loin nos recherches dans cette voie, faute d'animaux vaccinés.



Tout en cherchant surtout la persistance de l'immunité active chez les animaux vaccinés, nous nous sommes également préoccupé de savoir si les animaux injectés avec des vaccins, ne seraient pas capables de fabriquer des anticorps spécifiques.

Pour ce qui concerne les vaccins anticholérique et antipesteux, nous pouvons répondre par l'affirmative; le sérum des lapins qui ont reçu du vaccin anticholérique à plusieurs reprises se montra nettement agglutinant et préventif; il en est de même pour le vaccin antipesteux [2].



Pour terminer, faisons remarquer que les vaccins employés

1. La dernière souris que nous avons inoculée, avait été vaccinée 6 mois et demi auparavant; elle a eu une survie de 5 jours, alors que son témoin est mort en 36 heures.

2. Un cheval immunisé par M. Dujardin-Beaumetz, sur le conseil de M. Roux, avec du vaccin antipesteux, a fourni, après 5 injections, un sérum qui préservait les souris à la dose de 1/4 c. c, et leur donnait une survie de 10 jours à la dose de 1/10 c. c. lorsque 16 heures avant on inoculait le virus pesteux à la patte.

au cours de ces recherches, peuvent conserver pendant longtemps leurs propriétés spécifiques; ainsi, dans une de nos expériences, nous nous sommes adressé à un vaccin antipesteux qui avait été préparé il y a six mois et gardé dans un tube scellé à la température du laboratoire. Il se montra doué des mêmes propriétés que le vaccin fraîchement préparé. Il va sans dire que, lorsqu'on se propose de conserver les vaccins pendant un temps assez long, il faut avoir soin de retirer l'eau physiologique qui sert à les diluer.

CONCLUSIONS

L'immunisation par le sérum est rapide, inoffensive, mais fugace (8 à 15 jours).

Le sérum ajouté aux microbes exerce une action défavorable sur la production de l'immunité active.

L'immunité conférée par les corps microbiens seuls, (méthode de M. Haffkine) est de longue durée; elle s'établit au bout de 8 à 12 jours, pendant lesquels la résistance de l'organisme est affaiblie; l'injection est généralement accompagnée de troubles locaux et généraux.

L'immunité conférée par les vaccins — antipesteux, anticholérique et antityphique — est de longue durée; elle s'établit tantôt après 24 heures (choléra, b. typhique), tantôt après 48 heures (peste), pendant lesquelles la résistance de l'organisme est renforcée; l'injection ne s'accompagne d'aucun phénomène local, ni général quelque peu appréciable.

Les animaux injectés avec ces vaccins élaborent des anticorps spécifiques.

Les vaccins conservent, en tubes scellés, pendant longtemps, leurs propriétés immunisantes.

Recherches expérimentales sur le charbon symptomatique

PAR MM. E. LECLAINCHE (DE TOULOUSE) ET H. VALLÉE (D'ALFORT)

TROISIÈME MÉMOIRE[1]

Nous avons exposé, dans un précédent travail, des recherches sur l'immunisation contre le charbon symptomatique par les *cultures pures*, le *sérum préventif* et *l'emploi combiné des cultures et du sérum*.

Nous apportons ici, avec de nouvelles expériences, les résultats de l'utilisation pratique des différents procédés de vaccination.

I

VACCINATION PAR UNE SEULE INOCULATION D'UN VIRUS PUR ATTÉNUÉ

L'étude expérimentale de l'immunisation contre le charbon symptomatique nous avait conduits à formuler cette conclusion : « L'utilisation des virus purs permettra sans doute de réaliser la vaccination par une seule inoculation ; elle paraît devoir constituer une méthode de choix, en raison de sa sécurité et de sa simplicité. »

Le procédé répondait en effet aux desidérata des praticiens, qui réclament à la fois une intervention unique et la suppression de toute manipulation pour la préparation des vaccins.

L'utilisation de produits purs paraissait une garantie suffisante d'innocuité. L'épreuve de ceux-ci, pratiquée sur des bovidés entretenus dans les étables du laboratoire, montrait qu'ils réagissent à peine à l'inoculation, sous la peau de l'épaule, de 2 à 3 c. c. de culture chauffée à 70, 65 et même à 60°. Éprouvés après 9 jours, par une inoculation intra-musculaire d'un jus virulent qui tuait le témoin en 30 heures, les vaccinés résistaient parfaitement.

Il semblait que l'opération pût être pratiquée en pleine

1. Voyez ces *Annales*, 1900, pages 202 et 313.

sécurité dans toutes les conditions. L'application fut tentée sur 39 animaux. Les résultats immédiats ont été mauvais : 4 des vaccinés succombaient au charbon à la suite de l'inoculation. Les survivants étaient solidement immunisés ; aucun ne contracta le charbon dans les milieux gravement infectés où ils étaient entretenus.

Les détails de cette expérience ont été précisés dans notre mémoire sur les accidents consécutifs aux vaccinations[1]. Il était acquis désormais qu'une intervention certainement inoffensive pour des animaux indemnes de contamination antérieure est dangereuse pour des sujets exposés à des infections permanentes, dans des régions contaminées.

Un procédé d'immunisation solide, durable et sans danger restait à trouver. Deux nouvelles solutions s'offraient :

1° Abandonner la vaccination en un seul temps ; intervenir à deux reprises, avec des vaccins purs, liquides, d'énergie croissante, le premier vaccin étant aussi atténué que possible ;

2° Combiner l'injection de sérum préventif et l'inoculation de vaccin suivant l'un des modes utilisés déjà par l'un de nous pour le rouget du porc.

II

VACCINATION EN DEUX TEMPS PAR LES VACCINS LIQUIDES PURS

L'extrême sensibilité des bœufs « en état d'infection latente » à l'inoculation virulente expérimentale oblige à employer, pour la première vaccination, un virus très affaibli. D'autre part, il est nécessaire qu'une imprégnation vaccinante soit réalisée ; un vaccin trop faible laisserait l'organisme indifférent, et des accidents seraient provoqués par le second vaccin.

Nous avons montré antérieurement que les cultures chauffées à 80° ne produisent aucun accident chez le cobaye, et qu'elles ne confèrent pas l'immunité. L'expérience suivante prouve que le bœuf se comporte de la même façon :

Une vache bretonne reçoit, sous la peau de l'encolure, 10 c. c. du dépôt d'une culture sporulée très riche, chauffée à 80° pendant deux heures ; la matière inoculée renferme plusieurs

1. Ces *Annales*, 1902, p. 614.

dizaines de millions de spores. On ne constate pas trace de réaction. L'animal, éprouvé 15 jours plus tard par une inoculation virulente, succombe au charbon en 48 heures.

Nous utilisons comme *premier vaccin* une culture pure chauffée à 75° pendant 3 heures, capable de provoquer une très légère réaction chez les inoculés. Le *deuxième vaccin* est obtenu par un chauffage à 68-70° pendant le même temps.

On injecte 1 c. c. de chaque vaccin pour les adultes, et 1/2 c. c. pour les animaux âgés de moins d'un an. Les inoculations sont faites, à 8 ou 10 jours d'intervalle, sous la peau, en arrière de l'épaule, au flanc, ou à la queue, à la limite du tiers moyen et du tiers supérieur.

Mille et deux animaux ont été vaccinés en diverses régions :

Seine-Inférieure	568
Nièvre	182
Cantal	133
Hautes-Pyrénées	89
Nord	30

Tous les bovidés vaccinés font partie de troupeaux qui perdent chaque année entre 10 et 20 0/0 de leur effectif.

Le plus souvent, la vaccination est pratiquée à la suite d'un cas de mort par charbon, survenu dans un voisinage immédiat ou dans le troupeau même, par conséquent chez des animaux exposés à l'infection et contaminés pour la plupart.

Tous les vaccinés ont résisté ensuite au charbon, tandis que les non-vaccinés succombaient autour d'eux. Les résultats obtenus avec la vaccination unique démontraient d'ailleurs que les cultures pures confèrent une immunité solide.

Le principal intérêt de l'expérience réside dans les suites immédiates de l'opération : 7 animaux ont succombé ; 1 après la première vaccination ; 6 après la deuxième. Chez certains, les lésions étaient généralisées. Tous les accidents ont été relevés chez des sujets inoculés à la queue ; les vaccinés à l'épaule n'ont présenté aucun trouble.

Cette série d'expériences prouve que les vaccins purs, même très atténués, ne sont pas sûrement inoffensifs. Ils ne se comportent pas mieux que les vaccins pulvérulents impurs, et l'on a ainsi la preuve indirecte que les impuretés ne jouent qu'un rôle insignifiant dans la genèse des accidents post-vaccinaux. En

presque tous les cas, ceux-ci relèvent d'une invasion par les germes que recèlent en permanence les animaux entretenus dans les milieux infectés.

III

VACCINATION PAR L'EMPLOI COMBINÉ DU SÉRUM ET DU VIRUS

a) Vaccination par les mélanges sérum-virus. — L'un de nous a montré, il y a plusieurs années, que le mélange d'un sérum immunisant contre le rouget du porc avec une culture virulente du bacille, inoculé sous la peau ou dans les veines, ne tue pas les animaux sensibles et leur confère sans danger une immunité solide et durable. Il a montré ensuite que le mélange du vibrion septique avec un sérum immunisant ne tue pas le cobaye; mais, à l'encontre de ce qui se passe pour le rouget, il ne confère pas d'immunité durable.

Nous avons établi d'autre part que le mélange sérum-virus symptomatique ne tue pas le cobaye, mais ne l'immunise pas. Arloing fait une constatation analogue chez le mouton; mais il admet que ce même mélange donne l'immunité au bœuf.

Peu après, Arloing recommande un procédé de vaccination du bœuf basé sur l'emploi de 2 vaccins pulvérulents, d'énergie différente, inoculés *en une même séance,* après mélange avec 1/10 de c. c. de sérum préventif. Dans sa note à l'Académie des sciences, Arloing rapporte seulement des expériences faites sur le mouton; l'association du sérum à une très faible quantité du virus atténué serait capable « de modérer les effets immédiats du vaccin, tout en lui laissant ses effets immunisants ».

Ce que nous savons de la sensibilité aux vaccins les plus faibles des animaux entretenus dans les milieux infectés fait présager le danger d'une double attaque simultanée avec des vaccins forts, même associés à une dose homéopathique de sérum. On ne saurait d'ailleurs comparer le mélange de poudre et de sérum, préparé au moment de l'emploi, au mélange de sérum et de culture. La petite quantité de sérum inoculé est résorbée avant que la spore ait pu germer, avant même que l'appel phagocytaire se soit effectué, et l'opération revient à inoculer des vaccins pulvérulents forts à un animal traité par 1/10 ou 1/5 de c. c. de sérum, doses manifestement insuffisantes.

On ne peut admettre davantage que la sensibilisatrice du sérum ait été fixée en quelques minutes par les spores, enfermées dans des écailles d'albumine cuite.

La méthode ne paraît donc pas inoffensive *a priori*, et il est douteux qu'on se hasarde à l'utiliser dans la pratique. L'expérience va nous montrer qu'elle est incertaine dans ses résultats.

Les expériences faites à Nevers, par Arloing, en septembre 1900, sont déjà démonstratives à cet égard; puisque certains des vaccinés ont succombé à l'épreuve. Nous apportons de nouveaux documents. On a utilisé dans ces recherches un sérum très actif, fourni par le cheval.

VACHE XX. — Reçoit, sous la peau de l'épaule, un mélange de 10 c. c. sérum et 10 gouttes sérosité virulente. *Meurt du charbon en 50 heures;* lésions locales presque nulles; envahissement de tous les muscles.

VACHE XXI. — Reçoit, sous la peau de l'épaule, un mélange de 2 c. c. sérum avec 10 gouttes sérosité virulente. *Aucun trouble consécutif.*

COBAYE 400. — Reçoit dans la cuisse 5 c. c. sérum mélangé avec 5 gouttes sérosité virulente. *Meurt en 30 heures.*

COBAYE 401. — Inoculé en même temps que le précédent avec 2 c. c. sérum et 5 gouttes sérosité. *Résiste.*

VACHE XXV. — Reçoit, sous la peau de l'épaule, un mélange de 2 c. c. sérum avec 10 gouttes sérosité virulente. *Meurt du charbon en 72 heures;* pas de lésions locales; tous les muscles altérés.

VACHE XXVI. — Reçoit, sous la peau de l'épaule, un mélange de 2 c. c. de sérum avec 6 gouttes de sérosité virulente. *Résiste.*

Les mélanges sérum-virus sont donc inconstants dans leurs effets immédiats chez le bœuf. La même variabilité est d'ailleurs constatée chez le cobaye et nous l'avons signalée déjà.

D'autre part, les sujets qui résistent au traitement ne sont pas immunisés à coup sûr. La preuve en est fournie par l'expérience suivante :

VACHE XXI (voir ci-dessus). A résisté à l'inoculation du mélange 2 c. c. sérum et 10 gouttes sérosité.

VACHE XXVI (voir ci-dessus). A résisté à l'inoculation du mélange 2 c. c. sérum et 6 gouttes sérosité.

Les deux vaches sont éprouvées, 18 jours après la vaccination, avec une même dose de virus.

La vache XXI succombe. La vache XXVI résiste, quoique ayant reçu une dose moindre de virus.

Il est donc acquis que les inoculations du mélange sérum-

virus sont aussi peu sûres dans leurs effets immédiats qu'incertaines dans leurs résultats éloignés. La substitution de virus pulvérulents et impurs aux virus liquides purs employés par nous ne peut qu'aggraver les incertitudes et les inconvénients du procédé.

La vaccination par le mélange de sérum immunisant et de virus, à la fois dangereuse et infidèle, est totalement à rejeter.

b) *Vaccination par les inoculations successives de sérum et de virus.* — Les premières recherches de Kitt montrent que le mouton acquiert une immunité solide et durable par les inoculations successives de sérum et de virus. Arloing confirme cette donnée et démontre que le même résultat est obtenu chez le bœuf.

A priori, la méthode des inoculations successives de sérum et de virus semble devoir éviter les dangers résultant d'une attaque d'emblée par les vaccins, même très atténués. L'un de nous a montré le parti que l'on pouvait en tirer en ce qui concerne la vaccination contre le rouget du porc.

Nous avons indiqué dans un précédent mémoire[1] le mécanisme habituel des accidents post-vaccinaux dans les milieux infectés et le rôle de l' « infection latente antérieure » dans leur genèse. L'injection préalable de sérum aura cet effet de débarrasser l'organisme des germes qu'il recèle, ou tout au moins d'exalter momentanément sa résistance, et d'assurer l'innocuité de l'inoculation vaccinale.

Le bœuf qui reçoit sous la peau 10 c. c. de sérum, puis, 24 heures plus tard, 10 gouttes de sérosité virulente, présente à l'ordinaire une réaction thermique intense (plus de 2°) qui se prolonge pendant 2 à 3 jours; la réaction locale est exprimée par une plaque d'œdème de la largeur de la main; l'état général n'est pas modifié et l'appétit persiste.

Les animaux qui réagissent ainsi acquièrent une immunité solide et durable. Ils résistent ensuite à l'inoculation dans le muscle de 1 c. c. de sérosité virulente.

L'emploi du virus normal pour la vaccination serait dangereux à coup sûr. Déjà, certains des animaux d'expériences sont très éprouvés et les suites d'une semblable inoculation pourraient être désastreuses dans la pratique.

1. Ces *Annales*, 1902, p. 614.

Nos expériences de vaccination ont été pratiquées de la façon suivante. Les bœufs reçoivent une injection de 10 à 20 c. c. de sérum, suivant leur poids; puis, de 5 à 8 jours plus tard, une inoculation sous-cutanée à l'épaule, au flanc ou à la queue, avec 1 c. c. d'une culture pure chauffée à 70° pendant 3 heures. Nous avons employé deux sérums dont l'un possédait une activité double de celle de l'autre.

Six cent quarante-huit animaux ont été vaccinés en diverses régions :

Seine-Inférieure	87
Nièvre	373
Tarn-et-Garonne	88
Nord	75
Cantal	25

Les résultats des opérations sont indiquées ci-après :

	Animaux traités.	Pertes après la vaccination.	Pertes dans l'année.	Pertes avant la vaccination
Sérum faible.	201	8 (4 p. 100)	0	10 à 20 p. 100
Sérum fort.	447	0	1 (0,22 p. 100)	Id.

On voit qu'il est nécessaire d'employer un sérum assez actif pour éviter tout accident immédiat; à cette condition, on n'a rien à craindre de l'intervention, en quelque condition que ce soit.

Il est à remarquer que la méthode permet d'intervenir efficacement et sans danger dans les milieux gravement infectés, c'est-à-dire en des conditions où la vaccination proprement dite expose à des accidents et n'assure qu'une protection tardive. L'inoculation du sérum met *immédiatement* à l'abri les animaux menacés; toujours, la vaccination par notre procédé a été utilisée dans des troupeaux qui venaient de perdre un ou plusieurs animaux; toujours, la mortalité a cessé aussitôt après l'injection du sérum.

La solidité de l'immunité conférée par une seule inoculation d'un vaccin fort est démontrée par la statistique qui précède. On ne relève qu'un cas de mort dans l'année qui suit l'intervention sur un total de 648 vaccinés, soit une proportion insigni-

fiante de 0,15/100. Les troupeaux étaient entretenus cependant dans des milieux gravement infectés. Dans une étable du Tarn-et-Garonne, 14 animaux sont vaccinés, tandis que 2 ne sont pas traités. Ces deux derniers sont emportés par le charbon, tandis que les 14 autres restent indemnes.

Une plus large expérience viendrait-elle à démontrer que l'immunité conférée est insuffisante ou trop courte, dans certains milieux, qu'il serait très facile de la renforcer en pratiquant, 10 ou 12 jours après l'inoculation du premier vaccin, une seconde inoculation avec un virus chauffé à 65° seulement.

Nos recherches avaient pour objectif la découverte d'une méthode *simple* et *sûre* de vaccination, et nous arrivons à cette conclusion que ces deux qualités sont incompatibles. Deux interventions au moins sont indispensables pour assurer sans danger l'immunisation : elles exigent la préparation d'un sérum immunisant et de virus purs affaiblis.

Les indications des méthodes *simples* et des méthodes *sûres* sont faciles à prévoir.

Il est possible de tout sacrifier à la simplicité de l'intervention dans les pays où le bétail n'a qu'une faible valeur. Les méthodes rapides seront applicables aussi chez les populations résistantes au virus. C'est ainsi qu'elles ont été bien accueillies aux États-Unis, en Algérie et dans certaines parties de l'Italie. En ces conditions, l'inoculation à la queue permet d'employer des virus à peu près quelconques et les procédés empiriques triomphent.

Les conditions sont tout autres dans certains pays et en France en particulier. Les animaux entretenus ont une grosse valeur presque toujours; la morcellement de la propriété rend plus pénibles les pertes subies par les petits propriétaires ; la méthode doit être avant tout sans danger; on renonce pour longtemps à la vaccination si quelque accident se produit.

La méthode de vaccination que nous avons indiquée permet d'assurer sans danger la vaccination du bœuf contre le charbon symptomatique.

Nous croyons inutile de faire ressortir ses avantages sur les procédés utilisés jusqu'ici.

En résumé :

La vaccination par une seule inoculation d'un vaccin pur,

plus ou moins atténué, expérimentalement réalisable, expose dans la pratique à des accidents graves.

La vaccination en deux temps, avec des vaccins purs, même très atténués, n'est pas sûrement inoffensive.

Les inoculations du mélange sérum immunisant et virus exposent à des accidents immédiats et l'immunisation est incertaine.

La méthode de choix consiste en des inoculations successives de sérum immunisant et d'un virus pur atténué.

OBSERVATIONS

SUR LES ANOPHELES DE LA BANLIEUE DE PARIS

PAR MM. EDMOND SERGENT ET ÉTIENNE SERGENT

L'importance du rôle joué par les *Anopheles* dans la propagation du paludisme donne un grand intérêt aux observations détaillées que l'on peut faire de leurs conditions de vie, dans toutes les régions où on les rencontre. Car peut-être de ces études comparées sortiront d'utiles indications prophylactiques. Parmi ces contrées où les *Anopheles* sont loin d'être rares, il en est qui, cependant, sont indemnes de paludisme [1].

C'est le cas pour la banlieue de Paris; nous avons trouvé des *Anopheles* durant l'été et l'automne 1902 dans les bois de Meudon et de Saint-Cloud et au bois de Boulogne. L'existence d'*Anopheles* près de Paris avait été signalée par d'anciens observateurs.

Réaumur, dans ses *Mémoires pour servir à l'histoire des insectes*, publiés en 1738, donne de très bonnes descriptions accompagnées de dessins de « cousins capturés dans les campagnes des environs de Paris » en qui l'on reconnaît très facilement des *Anopheles*.

C'est d'après un spécimen recueilli à Paris que Joblot [2] publia la première description de la larve d'*Anopheles* [3]. Walckenaer [4] et Robineau-Desvoidy [5] mentionnent la présence

1. NUTTALL, *Journ. of Hygiene*, 1901, n° 1. — CELLI ET GASPERINI, *Il Policlinico*, 1901. — L. LÉGER, *Dauphiné médical*, sept. 1901. — ET. SERGENT, *Ann. Inst. Pasteur*, 1901.

F. Brazzola décrit la propagation d'une épidémie palustre dans un district de la commune de Bologne, non paludéen jusqu'alors, mais où de tout temps existèrent des Anopheles. *Annali d'Igiene sperimentale*, vol. XII (Nuov. Ser), 1902.

2. JOBLOT, professeur en mathématiques, *Observations d'histoire naturelle, faites avec le microscope*. Paris 1754, vol. I, part. II, chap. L. « Description d'un nouveau poisson que j'ai trouvé dans l'eau du bassin de Saint-Magloire du faubourg Saint-Jacques. » Il y a un excellent dessin de larve d'*Anopheles*. L'auteur dit : « Ces sortes de chenilles sont si rares, qu'elle est la seule que j'aie vue jusqu'à présent. » Il ajoute en note que c'est « le ver du cousin ».

3. G.-H.-F. NUTTALL et A.-E. SHIPLEY, The Structure and Biologie of Anopheles, *Journ. of Hygiène*, 1901, n° 1.

4. Dans sa *Faune parisienne*, Walckenaer signalait en 1802 un *C. trifurcatus*, qui, d'après Macquart, est le même qu'*A. bifurcatus*.

5. J.-B. ROBINEAU DESVOIDY. Essai sur la tribu des Culicides, *Mémoires de la Soc. d'Hist. natur. de Paris*, III, p. 390-413, 1827.

d'*Anopheles* à Paris. Ce fait est resté ignoré d'une façon générale, bien que la découverte de Ross (1898) ait fait de la recherche des *Anopheles* une question d'hygiène générale. L'année dernière, la discussion soulevée à l'Académie de médecine [1], à propos de moustiques, ne porta que sur l'abondance des *Culex* à Paris et près de Paris (vallée de la Bièvre) [2]. Nous n'avons jamais trouvé d'*Anopheles* à l'intérieur des fortifications, et nous avons des raisons de croire qu'ils n'y peuvent être que bien rares, mais le bois de Boulogne est aussi fréquenté des Parisiens que les jardins publics *intra muros*, surtout le soir.

Anopheles adultes. — Nous n'avons capturé qu'un petit nombre d'*Anopheles* adultes, relativement à la quantité de larves pêchées [3]. Il faut tenir compte, pour s'expliquer ce fait, de la difficulté apportée à la chasse de l'*Anopheles* ailé par le mimétisme dont il fait preuve. On le voit rarement, et seulement lorsqu'il est gorgé de sang, se poser sur un mur blanc. Il aime les coins sombres, les dessous de meubles, où il est peu visible. Au contraire, le *Culex* se pose au hasard sur le premier objet à portée. Une expérience édifiante consiste à lâcher en plein jour un *Anopheles* et un *Culex* dans une chambre : le *Culex* vole aux vitres de la fenêtre, ou bien va se poser sur le mur le plus rapproché. L'*Anopheles*, sans hésiter, va droit à un coin sombre d'où il ne bouge plus.

Le mois où nous avons trouvé la plus grande quantité d'*Anopheles* ailés est celui de septembre. A partir du 15 octobre, nous n'en avons plus vu dans les chambres. Au laboratoire, il y eut encore une éclosion le 10 novembre, et il y a encore des larves vivantes le 5 décembre.

Voici, à titre d'exemples, les nombres des moustiques capturés le 26 septembre dans une habitation du bois de Boulogne :

Anopheles maculipennis, 7 dont 6 femelles et 1 mâle

Culex pipiens, 19 dont 15 femelles et 4 mâles.

1. *Bulletin de l'Académie de médecine*, XLV, p. 474, 9 avril 1901, et *Rapport sur les Moustiques de Paris*, présenté par R. Blanchard à l'Académie de médecine le 30 juillet 1901. V. *Arch. de Parasit.* IV, n° 4, p. 615, 1901.

2. Polaillon, dans sa thèse de Médecine 1901, *Histoire naturelle et médicale des Moustiques* signale les *Anopheles* les plus rapprochés de Paris à Chantilly (40 kil. au N. de Paris). L'un de nous les signale la même année, à Mennecy, à 40 kil. au S. de Paris. (*Ann. de l'Inst. Past.* 1901.)

3. Comparer E.-O. Jordan. Notes on the occurence and habitat of *A. punctipennis* and *A. maculipennis* in the valley of the Androscoggin, *Journ. of Med. Research*, janv. 1902.

La maison est à moins de 100 mètres d'un étang où foisonnaient les larves d'*Anopheles*, mais absolument dépourvu de larves de *Culex*. Les *Culex* adultes capturés provenaient des fosses d'aisance.

Les femelles capturées ou écloses au laboratoire, en septembre, nous piquaient assez difficilement; en octobre, elles ne piquaient plus du tout[1]. Elles se nourrissaient de sucs de fruits et paraissaient vouloir entrer en hibernation, suspendues aux parois ou au plafond de leur cage dans la position classique (tête, thorax et abdomen en ligne droite, presque perpendiculaire au mur). A la fin d'octobre, la chaleur paraissait les incommoder. Chaque fois que la température de la chambre dépassait 20°, quelques-unes mouraient ; si on la maintenait entre 14° et 71°, aucune mort ne se produisait. Les mâles, naturellement, mouraient tous.

Larves. — Nous avons été étonnés de la grande abondance des larves que nous pêchions. C'est en octobre qu'elles furent le plus nombreuses : nous rappelons que c'est en septembre que nous trouvions *dans les chambres* le plus d'adultes. Nous n'avons jamais vu davantage de larves d'*Anopheles* dans les localités très paludéennes d'Algérie que nous avons explorées. Le 3 octobre, on prenait dans l'étang de Chalais par coup de filet 21, 15, 14 larves ou nymphes; le 13 octobre, 34, 29, 30, 26. A la même époque, à Maison-Carré (Algérie), point très éprouvé par le paludisme, avec les mêmes engins et la même technique, on prenait en moyenne 15 larves d'*Anopheles* par coup de filet.

Les nymphes capturées sont peu nombreuses en été ; parfois, nous n'en prenions aucune dans une pêche de 200 ou 300 larves. Plus défiantes que les larves, elles plongent avant celles-ci, au moindre ébranlement des couches liquides. On peut supposer que c'est une raison pour qu'elles échappent plus facilement que les larves au filet de pêche. Une autre raison de la rareté des nymphes, par rapport au nombre de larves, doit être, comme le pensent G.-H.-F. Nuttall et A.-E. Shipley [2], la mortalité effrayante qui sévit sur les larves à tous les âges. Sur plusieurs centaines de larves recueillies cette année, 149 adultes seulement sont éclos au laboratoire.

1. Le 15 novembre, des *A. maculipennis* femelles, arrivées à l'état adulte d'Algérie, nous piquaient très facilement à Paris.
2. *Loc. cit.*

A la fin de la saison, la proportion des nymphes augmente énormément. Ainsi, le 23 octobre, à Chalais, un coup de filet donne 5 grosses larves et 7 nymphes. Un autre, 14 grosses larves (de 5 à 8 ‰), 3 petites larves (2 à 4 ‰) et 10 nymphes.

A partir du 1er novembre, le nombre de larves ou nymphes diminue partout, et le 8 novembre, nous n'en trouvons plus. (Toutefois, il y en a encore à cette date dans les bocaux du laboratoire, dans des conditions forcément un peu artificielles.) Les larves d'*Anopheles maculipennis* n'hivernent donc pas dans la région de Paris[1].

Habitat. — Tous les gîtes de larves d'*Anopheles* que nous avons explorés se ressemblent complètement. Les principaux caractères en sont : eau limpide, pas absolument stagnante, ensoleillée, présence de plantes d'eau (*Lemna*, algues vertes, *Nénuphars*), ce qui exige que le fond de la pièce d'eau ne soit pas maçonné, surtout sur les bords où se tiennent de préférence les larves[2].

Ces conditions sont réunies, par exemple, par l'étang de Chalais ; aussi les larves d'*Anopheles* y sont-elles nombreuses. L'eau de cet étang est envoyée par une machine élévatoire au réservoir du Bel-Air, au-dessus de la terrasse de Meudon et dans le bassin de l'Orangerie du parc de Meudon. Ces 2 pièces d'eau ne renferment pas de larves d'*Anopheles*. La cause en est, sans doute, que le réservoir contenant l'eau distribuée à Meudon est souvent nettoyé, débarrassé de ses herbes, et que le bassin de l'Orangerie est peuplé de poissons rouges. De même, l'étang de Villeneuve à Garches contient des larves d'*Anopheles*, les bassins du parc de Saint-Cloud, qui sont au-dessous, bien cimentés et bien entretenus, n'en renferment pas. Les étangs qui longent le champ de courses de Longchamp sont presque naturels ; ils sont infestés d'*Anopheles* qui manquent dans les 2 grands lacs, dont les bords sont pavés, et que trouble une nombreuse population volatile.

***

Ennemis des Anopheles. — Ce besoin d'eau bien claire mani-

1. D'après Galli-Valério et M. Rochaz, *Centralblatt für Bakt.* 1902, p. 601, les larves d'*A. bifurcatus* hivernent à Lausanne, mais non celles d'*A. maculipennis*.
2. Des pièces d'eau de ce genre n'existant pas à l'intérieur des fortifications, nous croyons peu probable que des femelles d'*Anopheles* viennent pondre dans Paris.

festé par les larves d'*Anopheles* tient, croyons-nous, à ce que leurs plus dangereux ennemis sont les microbes des eaux pourries. Les larves de *Culex* vivent parfaitement et même avec prédilection dans les eaux stagnantes où macèrent des débris végétaux, à l'ombre épaisse de grands arbres : véritables milieux de culture, protégés de l'action bactéricide du soleil, où les microbes poussent en voile à la surface.

Des larves d'*Anopheles*, placées dans des conditions analogues, sont bientôt couvertes de filaments mycéliens, leurs mouvements se ralentissent, elles meurent au bout de quelques jours. Les observateurs ont remarqué qu'ils perdaient beaucoup de larves d'*Anopheles* dans leurs aquariums, et qu'il était à peu près impossible de mener à terme la vie d'une larve née au laboratoire. Nous croyons que cela tient surtout au développement de micro-organismes dans l'eau de l'aquarium.

Nous avons fait à ce sujet l'expérience suivante :

De jeunes larves de 1 à 3 m/m sont mises, le 3 octobre, dans 3 bocaux contenant chacun 3 litres d'eau pure avec quelques *Lemna* (5 à 6 larves dans chaque bocal). Le 1er bocal est placé à la lumière diffuse à 22°, température constante jour et nuit. Le 2e bocal est à la lumière du jour dans une chambre (15° à 20°). Le 3e est placé au dehors (5° à 15°) à la lumière. On ne change pas l'eau.

Dans le 1er bocal, l'eau se trouble vite ; un voile apparaît à la surface, les larves meurent en quelques jours.

L'eau du 2e bocal est restée claire plus longtemps ; les larves ont grossi, jusqu'à atteindre environ 6 à 7 m/m ; elles sont mortes vers le 20 octobre.

Dans le 3e bocal, où l'eau est demeurée limpide, il y a une larve qui ne meurt que gelée, le 5 décembre (après 63 jours), une autre est morte le 5 novembre seulement, plus d'un mois après son éclosion.

La température basse et variable, l'insolation, semblent donc être favorables à la vie des larves, parce qu'elles sont funestes au développement des microbes.

Les poissons, à part les cyprins, nous paraissent peu dangereux pour les larves d'*Anopheles*, dans la région étudiée. Ces larves, cachées dans les plantes aquatiques, fourmillaient dans des étangs très poissonneux.

Enfin, les larves d'*Anopheles* trouvent des ennemis parmi elles-mêmes. Nous avons remarqué, comme Schaudinn [1], que,

1. Fr. Schaudinn, *Studien über Krankheitserregende Protozoen. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*. Bd IX, Heft. 2, 1902, p. 186.

si les larves de *Culex* sont nettement herbivores, celles d'*Anopheles* sont bien plus volontiers carnivores. Souvent, nous les avons vues dévorer de petits crustacés, des moucherons tombés à la surface de l'eau, les cadavres de leurs congénères, les dépouilles des nymphes et s'attaquer à d'autres *Anopheles* sortant de leurs nymphes. Au moment où l'insecte ailé pose ses pattes à la surface de l'eau pour donner le temps à ses ailes de sécher, nous avons vu plusieurs fois de grosses larves de 7 à 8 $^{m}/_{m}$ se précipiter sur ces pattes. L'imago, s'envolant, les traînait un instant à la surface de l'eau. La patte examinée au microscope laissait voir un moignon informe; le dernier article du tarse manquait parfois complètement.

Durée de la vie larvaire et pupale. — La durée de la vie des larves d'*Anopheles* est assez malaisée à calculer, en raison de la difficulté qu'il y a à la faire s'écouler entière au laboratoire. Nous sommes arrivés à élever une larve depuis la taille de 2 $^{m}/_{m}$ environ jusqu'à celle de 8 $^{m}/_{m}$ en 36 jours. Une larve pêchée le 13 octobre à 4 $^{m}/_{m}$ environ (15 jours d'âge à peu près?) est devenue imago le 10 novembre, 26 jours après. La vie moyenne d'une larve paraît être de 30 à 40 jours.

Pour la vie de la nymphe, on peut avoir des chiffres plus précis. En septembre, maxima 20° minima 17°, l'imago naissait au bout de 4 à 6 jours. A la glacière (5°), l'évolution était retardée ordinairement de 2 jours.

Sexe des adultes éclos au laboratoire. — Sur les 149 *Anopheles* éclos en aquarium, il y avait 97 femelles et 52 mâles. Dans le même temps, naquirent 165 *Culex*, dont 122 femelles et 43 mâles. Plusieurs *Anopheles*, au moment de leur éclosion, s'amputaient d'une, de deux ou même de trois pattes. Un certain nombre ne pouvaient même pas quitter leur dépouille nymphale et mouraient.

Presque tous les *Anopheles* que nous avons capturés appartenaient à l'espèce *A. maculipennis* Meigen (*sclaviger* Fabricius). Quelques *An. bifurcatus* Linné, adultes, furent pris, mais nous n'avons pas pêché leurs larves.

Les *Culex* sont d'une extrême rareté dans les gîtes à *Anopheles*. Nous pensons que cela tient à la présence constante, dans les mêmes eaux que les *Anopheles*, d'une punaise d'eau *Ilyocoris cimicoïdes*. De nombreuses expériences nous ont montré que cette

punaise capture très facilement les *Culex* en prenant leur grosse tête pendante, alors que les *Anopheles* flottant à la surface lui échappent. Les larves de *Culex* trouvés en compagnie de larves d'*Anopheles* appartenaient aux espèces *C. pipiens* Linné *C. spathipalpis* Rondani, qui n'a pas encore été signalée dans cette partie de la France, et *C. annulatus* Schrank. Dans Paris même, nous avons capturé *C. pipiens*, *C. annulatus*.

Il existe donc aux portes de Paris des quantités considérables d'*Anopheles*. Il y a d'autre part à Paris un certain nombre d'anciens paludéens qui ont contracté les fièvres aux colonies et ont encore parfois des accès. Et pourtant, il ne sévit pas ici d'endémie palustre. Nous n'avons même pas entre les mains une seule observation complète et précise de cas de paludisme contracté dans la ville ou la banlieue: et nous serions reconnaissants aux médecins qui voudraient bien nous communiquer des observations de ce genre.

Il doit donc exister des conditions encore indéterminées, pour que le paludisme puisse s'établir dans un pays à l'état endémique.

Nouveau Broyeur pour la préparation de la pulpe d'organes

Par M. LATAPIE.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

On a fréquemment besoin dans les laboratoires d'obtenir une pulpe d'organes, suffisamment fine et homogène pour être injectée aux animaux d'expérience à l'aide d'une seringue ordinaire. Le broyage au mortier ne permet ni l'asepsie des opérations ni la préparation d'une pulpe convenable. On ne peut en effet songer à broyer par ce procédé un organe entier, pour peu qu'il ait une certaine consistance, et, d'autre part, il est difficile d'éviter la présence de fragments assez gros pour obstruer l'aiguille qui sert à l'inoculation.

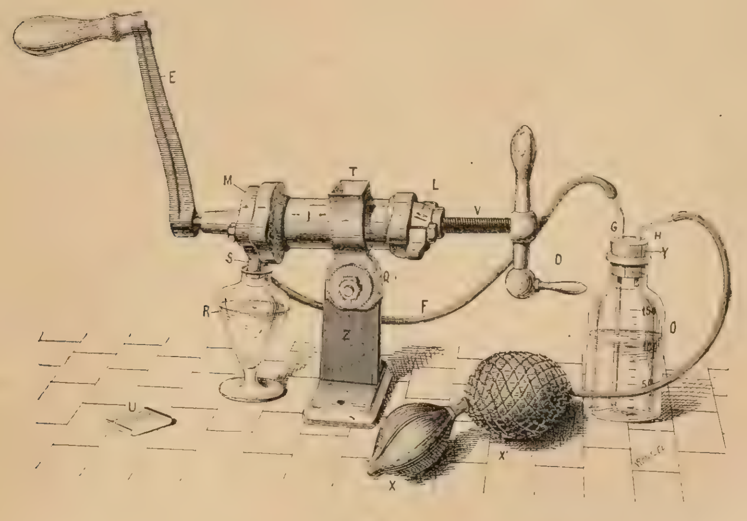


Fig. 1.

Ces difficultés nous ont amené à imaginer un appareil facile à stériliser, et fournissant une pulpe qui répond à toutes les exigences.

Description. — L'appareil (fig. 1) se compose essentielle-

ment d'un cylindre creux portant à une extrémité le système de couteaux destiné à diviser les organes.

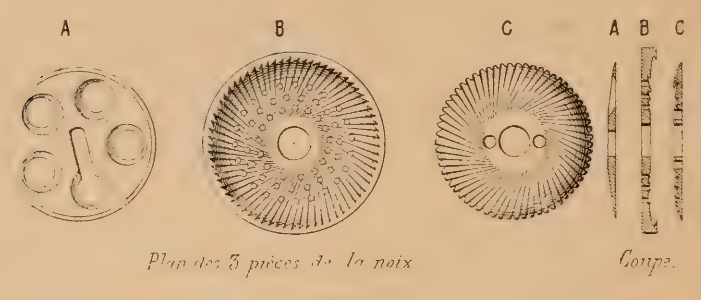


Fig. 2.

Ce système comprend (fig. 2) : 1° un disque A d'un diamètre inférieur à celui du cylindre, percé de 5 ouvertures circulaires évasées vers l'intérieur du cylindre et dont le bord, en contact avec la pièce B est tranchant ;

2° Un second disque B, d'un diamètre plus grand, plan concave. Sa face plane, en contact avec le couteau A, est percée d'un assez grand nombre d'ouvertures circulaires de 1 à 2 millimètres de diamètre, qui aboutissent au milieu des cannelures tranchantes que porte la face concave ;

3° En contact avec celle-ci est une pièce C qui a la forme d'un plan convexe se plaçant dans le creux de la pièce B. La face convexe de C porte des cannelures tranchantes dirigées en sens inverse de celles de B.

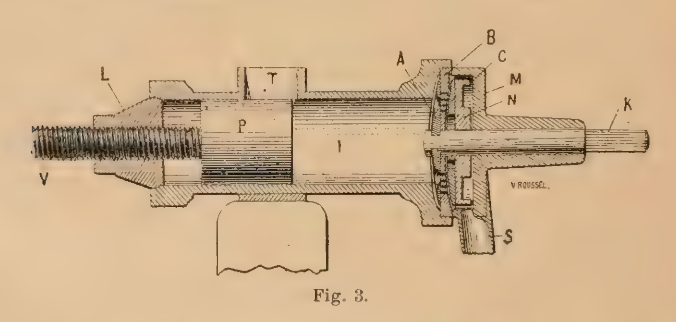


Fig. 3.

Ces trois pièces s'emmanchent sur un axe en acier K qui porte un disque de laiton N ; cet assemblage est lui-même soutenu par une partie M munie de deux oreilles qui viennent

s'emboîter sur les tiges de deux boulons de serrage, lesquels se vissent dans un élargissement de l'extrémité du cylindre I. La partie de l'axe K qui dépasse la pièce M est munie d'un carré sur lequel on peut monter soit une manivelle E (fig. 1), soit une poulie mise en mouvement par un moteur quelconque. Dans ce mouvement de rotation, A et C tournent avec l'axe, le disque B étant fixé par la pression qu'exerce sur lui la pièce M.

La substance à broyer est introduite dans le cylindre par une ouverture T que l'on peut obturer à l'aide d'un couvercle U. Elle est progressivement repoussée contre les couteaux au moyen d'un piston P qui avance sans tourner à l'aide d'une vis V, portant une manivelle D, et tournant dans un écrou fixe L. Ce dernier est appuyé contre l'extrémité du cylindre par la pression de deux écrous disposés comme ceux qui retiennent la pièce M à l'autre extrémité.

La pulpe obtenue sort par un conduit S et peut être recueillie dans un vase R. Il est préférable de diluer la matière broyée en injectant lentement un peu d'eau physiologique dans la chambre située entre M et N.

Le liquide est contenu dans un flacon O: la pression exercée par une poire double en caoutchouc XX' le force à passer par le tube F qui aboutit à un téton porté par la pièce M (et non visible sur la figure).

Le cylindre I doit être parfaitement alésé à l'intérieur : il est porté par l'intermédiaire d'une bride Y munie d'un écrou de serrage sur un pied de fonte Z, solidement fixé à une table. Cette disposition permet de donner à l'appareil l'inclinaison désirée.

Toutes les pièces en contact avec les organes à broyer sont en laiton nickelé, à l'exception des couteaux A B et C, qui sont en acier trempé.

L'appareil tout entier, sans la manivelle bien entendu, est stérilisée au four à flamber ; si on emploie l'autoclave ou l'eau bouillante, la stérilisation ne doit être faite qu'au moment où l'on doit se servir de l'appareil, afin d'éviter la formation de rouille sur les couteaux. Lorsqu'il est refroidi, on le fixe sur son pied et on introduit l'organe à broyer, coupé en fragments s'il est trop volumineux, par l'ouverture T. On tourne la manivelle D de la main gauche, de façon à amener l'organe au contact des outeaux ; on commence alors à injecter de l'eau physiologique

en arrière de ceux-ci et on les fait tourner en agissant avec la main droite sur la manivelle E, en comprimant peu à peu la substance. On doit faire progresser le piston très lentement, en faisant faire environ un quart de tour à la vis V pour 5 à 6 tours de la manivelle E.

Dans ces conditions, il s'écoule dans le vase stérile placé au dessous de l'ajutage S une pâte claire, parfaitement homogène, qu'il est facile d'inoculer aux animaux.

L'expérience d'une année, faite à l'Institut Pasteur, au laboratoire de M. Metchnikoff, nous a permis de constater que notre appareil donne de bons résultats avec les organes les plus divers. M. le Dr Charcot, qui l'a expérimenté pour le broyage d'un certain nombre de tumeurs cancéreuses, a bien voulu nous en exprimer sa satisfaction [1].

Il nous semble que cet appareil pourrait recevoir un certain nombre d'applications, parmi lesquelles le broyage de la viande crue destinée à certains malades semble tout indiqué, car il fournirait une matière aussi parfaitement divisée que possible. Du reste, il existe plusieurs modèles munis de couteaux qui permettent de faire varier la finesse de la pulpe. La facilité avec laquelle on peut le démonter et le nettoyer permettrait de le confier même à des personnes non exercées.

1. Voir les *Comptes rendus de la Société de biologie*, 1902, page 15.

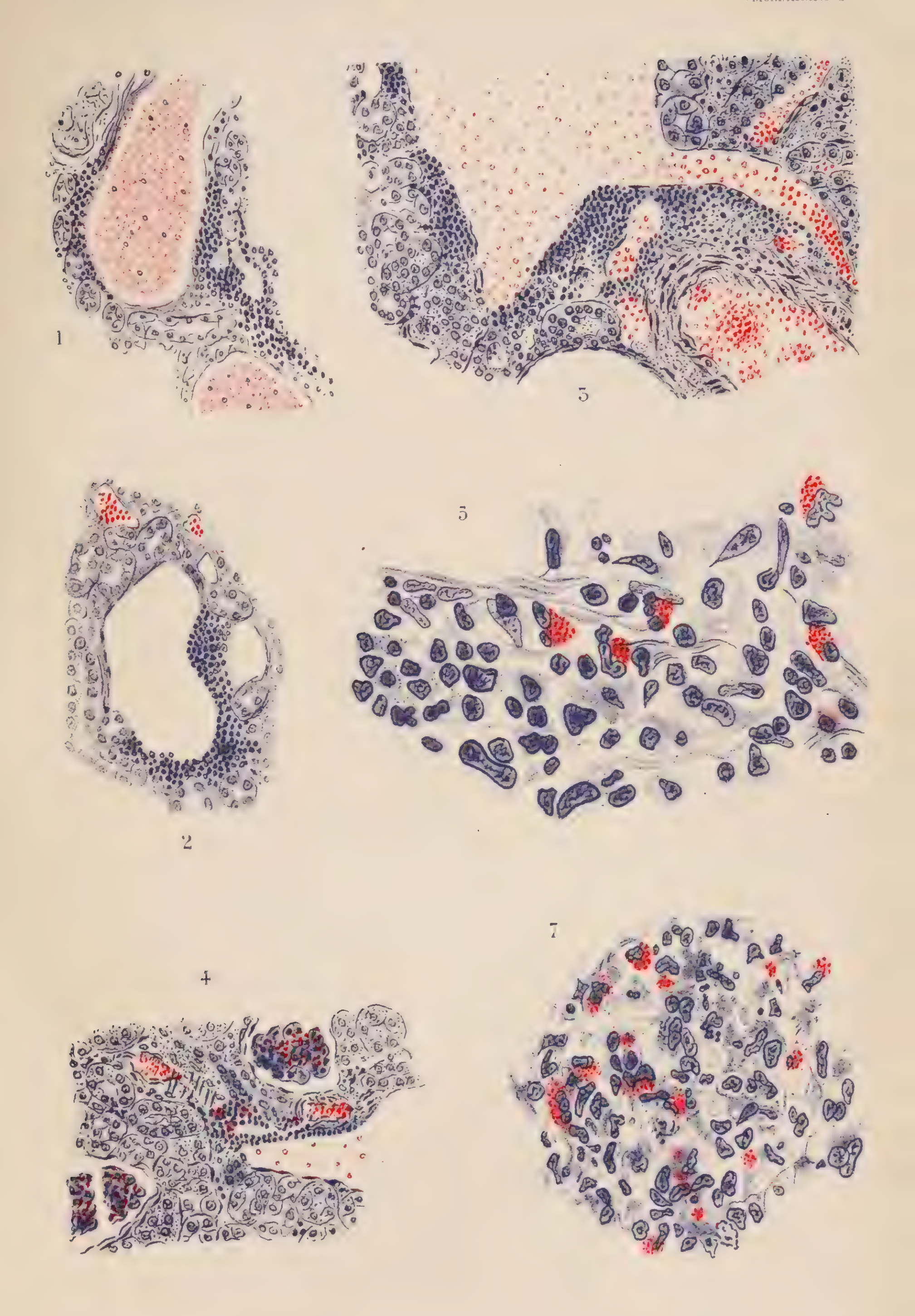
TABLE DES MATIÈRES

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

REVUES CRITIQUES

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

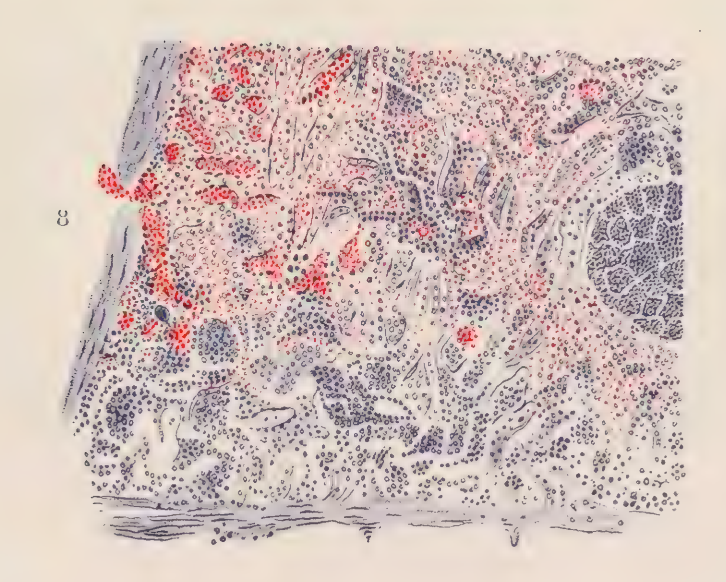
Le Gérant : G. Masson.


1
3
5
2
7
4

6

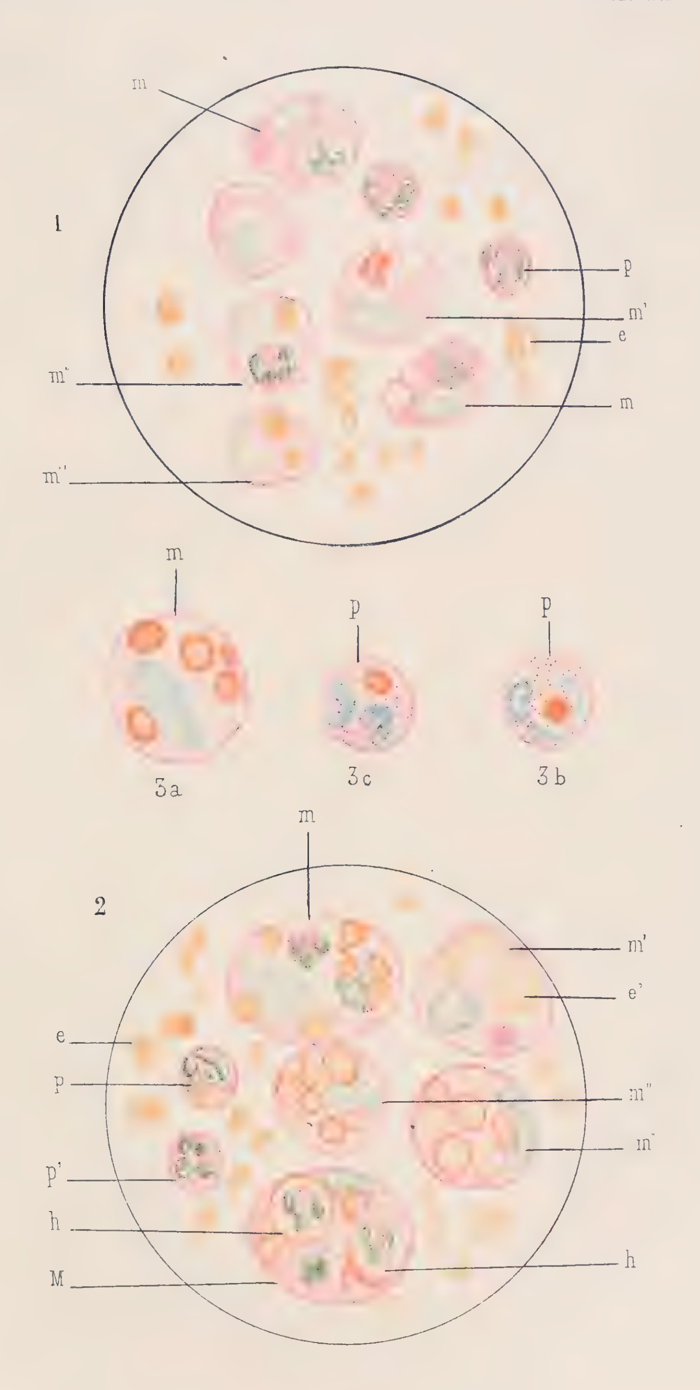
9

8





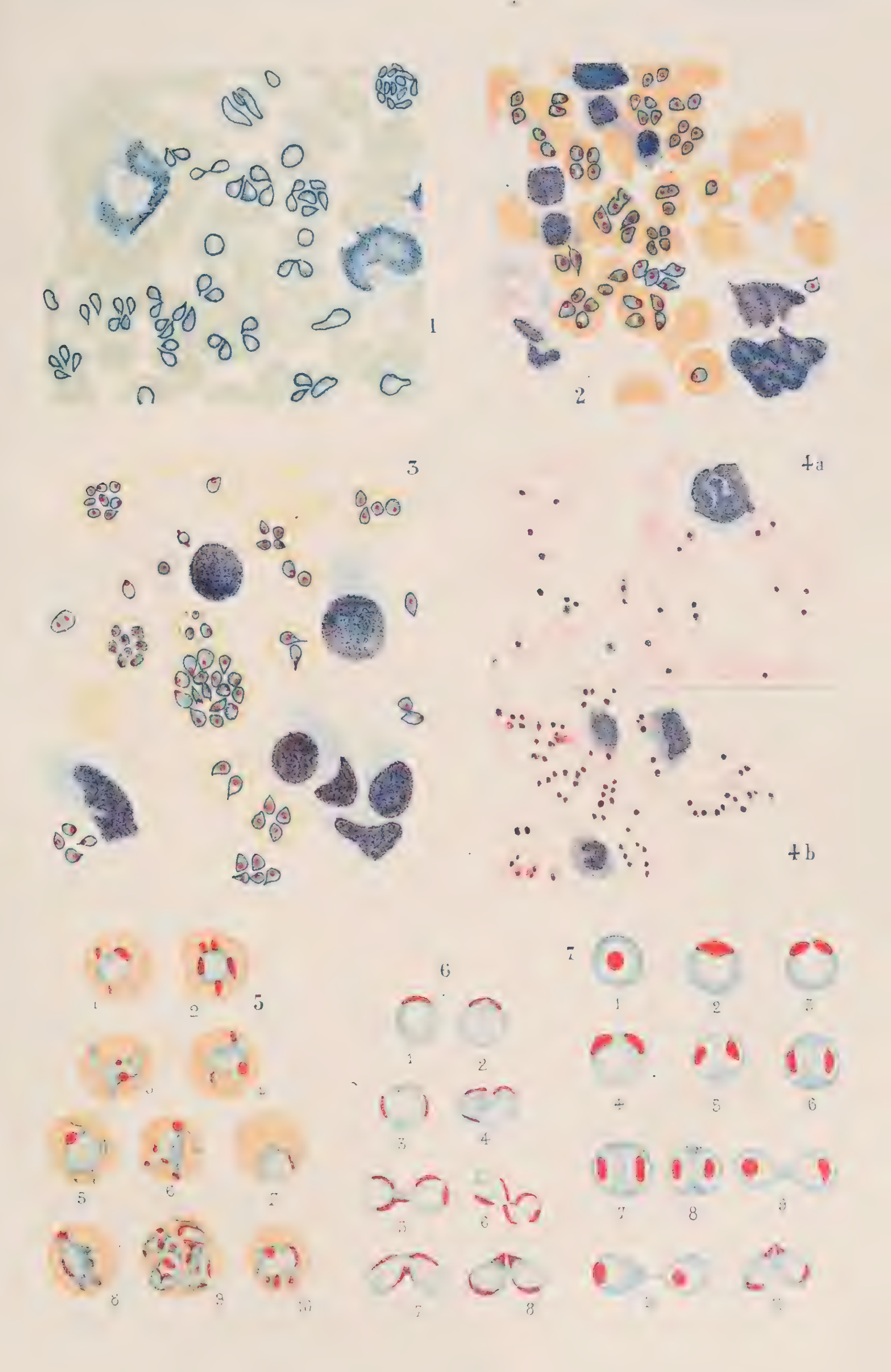
Dr Levaditi, del. V. Roussel, lith.
Imp. L. Lafontaine, Paris



Dr Levaditi, del.

V. Roussel, lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris.

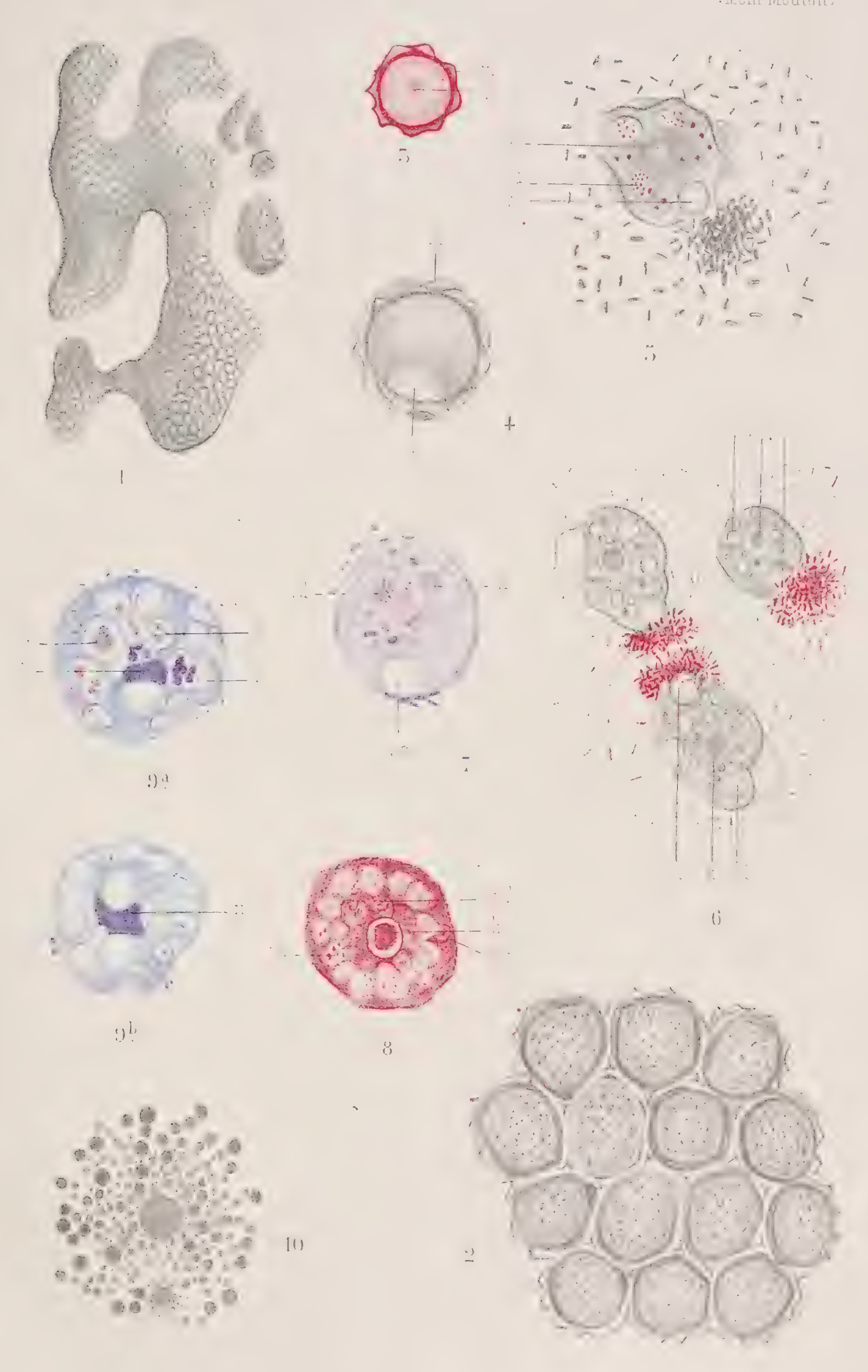


Motas, del.

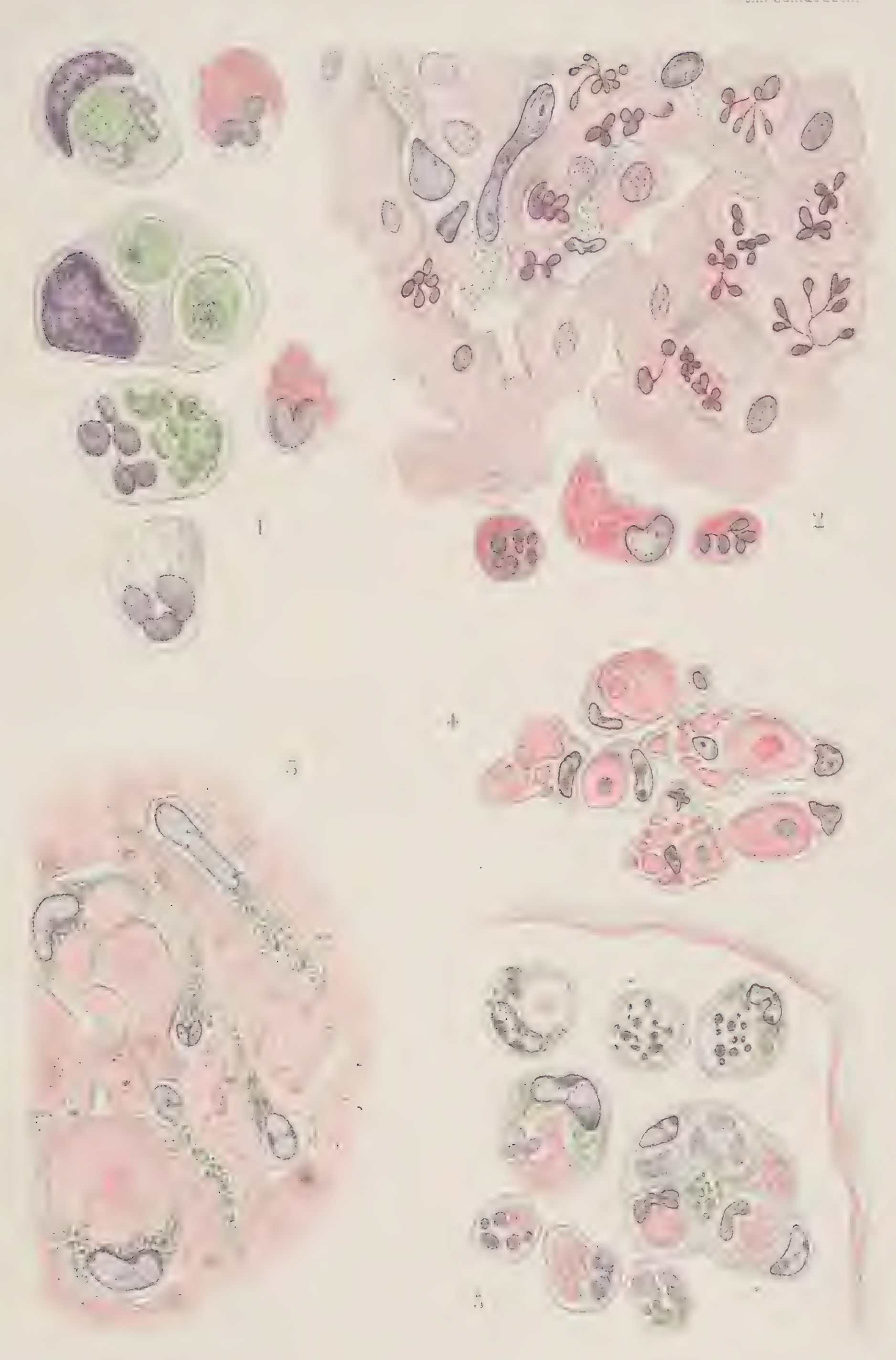
Imp. L. Lafontaine, Paris.



Imp. L. Lafontaine Paris



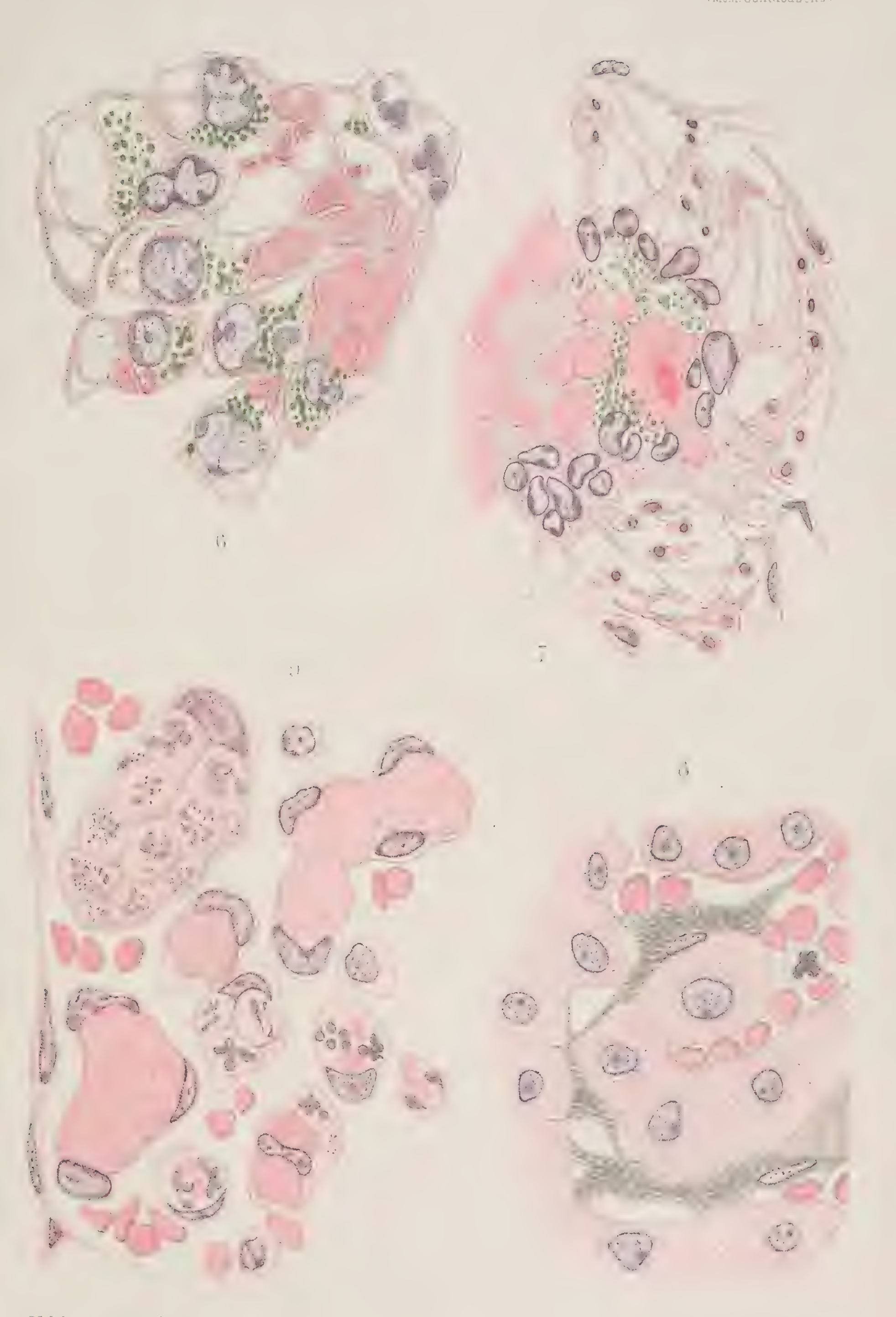
Dr Borrel, del. V. Roussel lith.



Dr J. Cantacuzène del.

V. Roussel, lith.

Lafontaine, Paris.



Dr J. Cantacuzène del. V. Roussel lith.

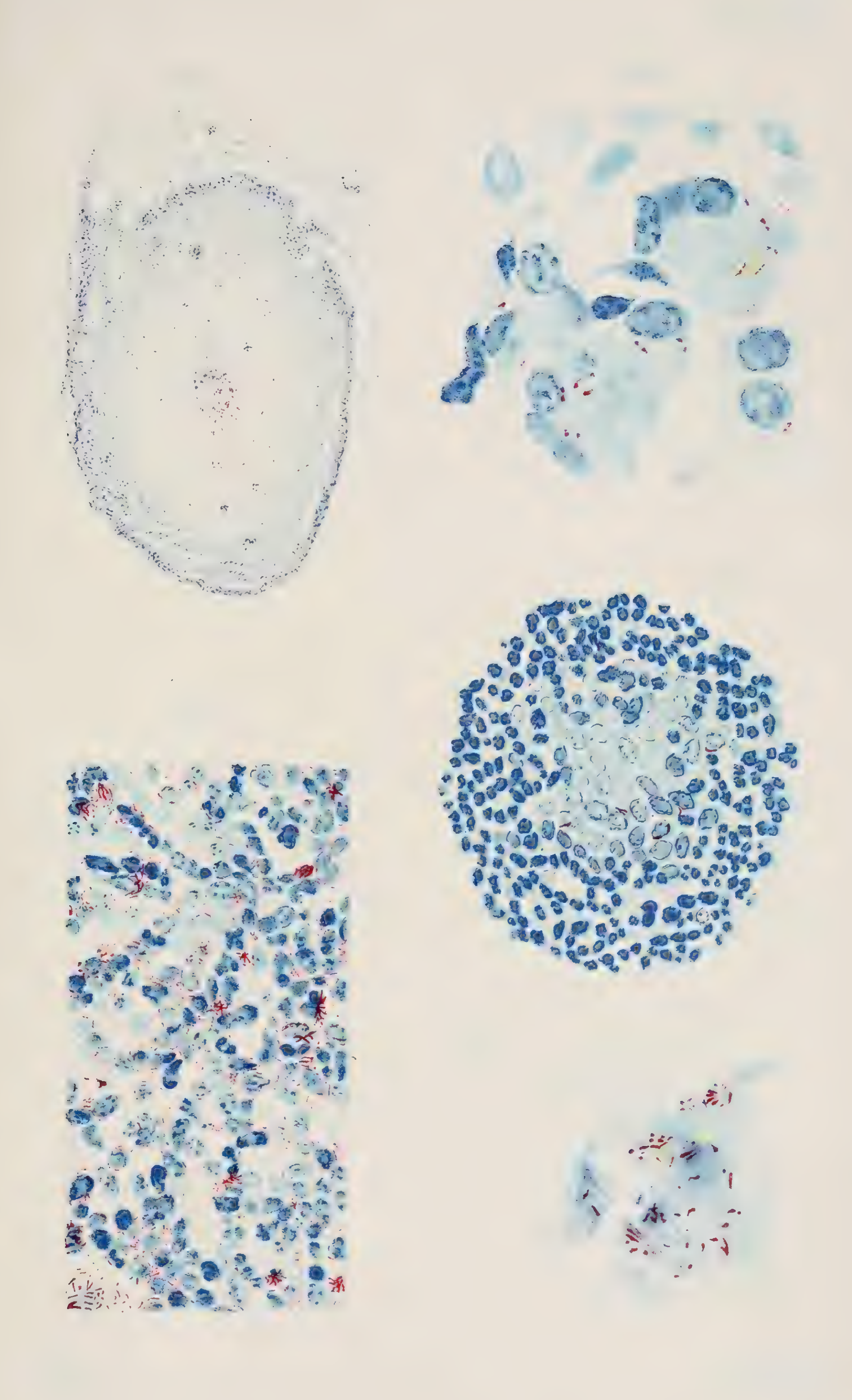
Imp. L. Lafontaine, Paris.

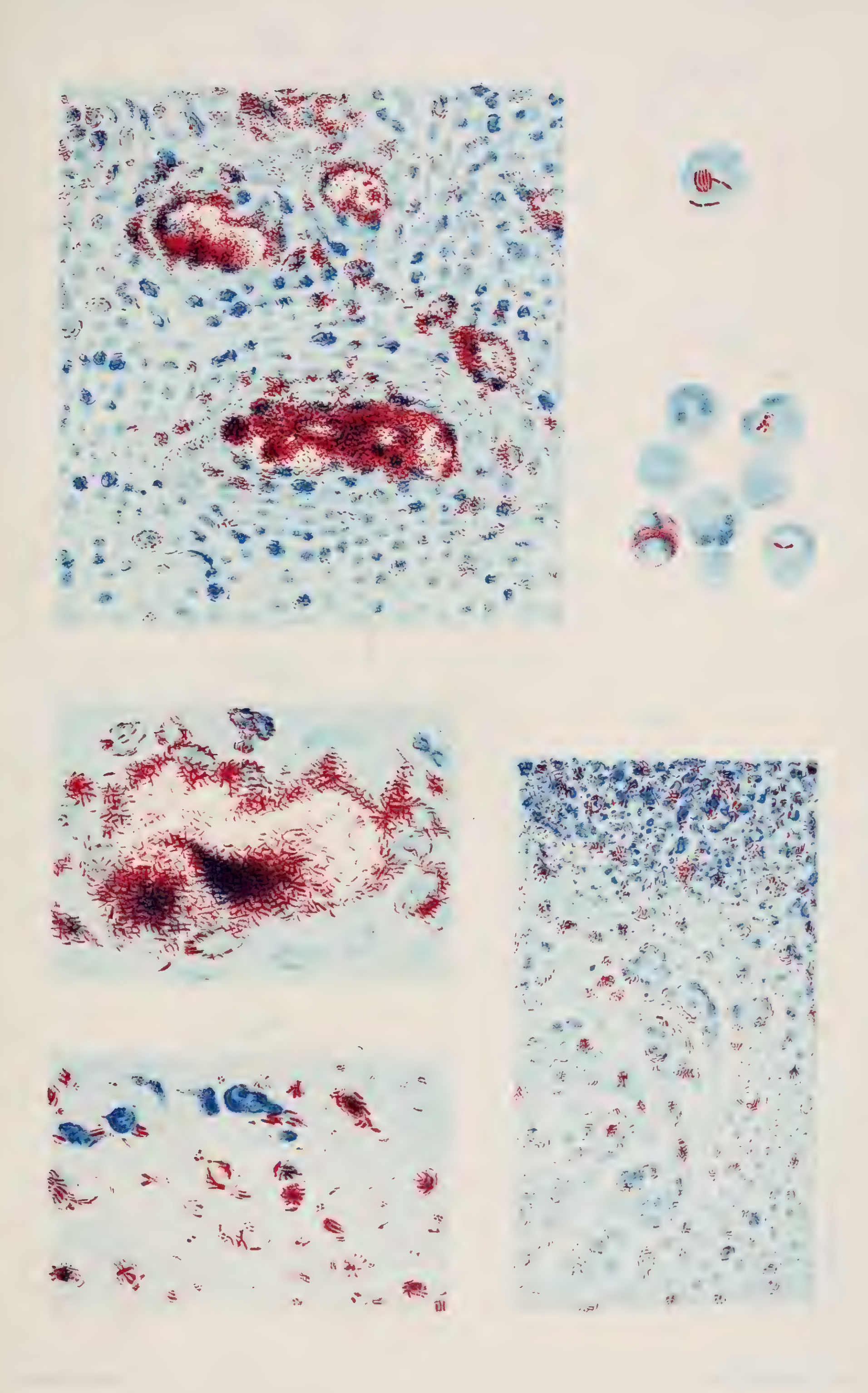
1



2



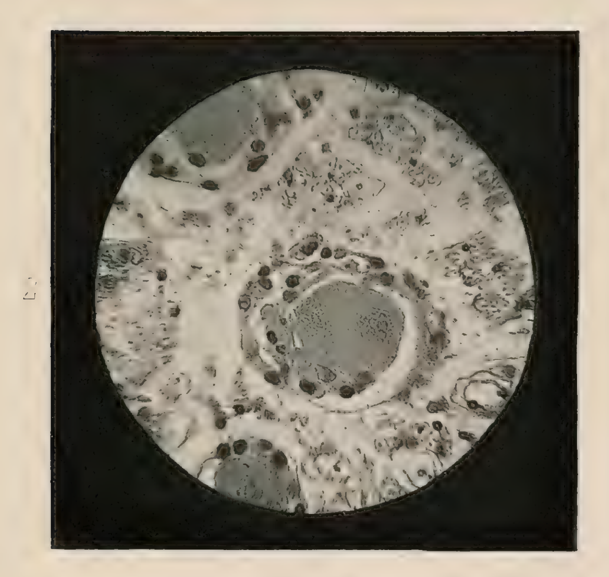




1



2





El. Metchnikoff. del. Imp. L. Lafontaine E. Rémy, lith.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE M. PASTEUR

ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

MM. Dr **CALMETTE** (**A.**), directeur de l'Institut Pasteur de Lille ;
CHAMBERLAND, chef de service à l'Institut Pasteur ;
Dr **GRANCHER**, professeur à la Faculté de médecine ;
Dr **LAVERAN**, membre de l'Institut de France ;
METCHNIKOFF, chef de service à l'Institut Pasteur ;
NOCARD, professeur à l'École vétérinaire d'Alfort ;
Dr **ROUX**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
Dr **VAILLARD**, professeur au Val-de-Grâce.

TOME SEIZIÈME

1902

AVEC QUATORZE PLANCHES

PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

A LA MÊME LIBRAIRIE

Traité de Microbiologie, par E. Duclaux, directeur de l'Institut Pasteur, professeur à la Sorbonne.

Tome I : **Microbiologie générale,** 1 vol. grand in-8°, avec figures. 15 fr.
Tome II : **Diastases, toxines et venins,** 1 vol. grand in-8°, avec fig. 15 fr.
Tome III : **Fermentation alcoolique,** 1 vol. grand in-8°, avec fig. 15 fr.
Tome IV : **Fermentations variées des diverses substances ternaires.** 1 vol. grand in-8° avec figures.

(L'ouvrage formera 7 volumes qui paraîtront successivement.)

Traité de Pathologie générale, par Ch. Bouchard, membre de l'Institut, professeur de pathologie générale à la Faculté de médecine de Paris. Secrétaire de la rédaction : G.-H. Roger, professeur agrégé à la Faculté de médecine, médecin des hôpitaux. 6 volumes grand in-8°, avec nombreuses figures dans le texte.......... 126 fr.

Précis de Microbie : *Technique et microbes pathogènes*, par le Dr L.-H. Thoinot, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin des hôpitaux, et E.-J. Masselin, médecin-vétérinaire. Ouvrage couronné par la Faculté (*Prix Jeunesse*). *4e édition, revue et augmentée,* avec 210 figures, dont 20 en couleurs. 1 volume in-16 diamant, cartonné à l'anglaise, tranches rouges. 8 fr.

La Pratique dermatologique, *Traité de Dermatologie appliquée,* publié sous la direction de MM. Ernest Besnier, L. Brocq, L. Jacquet. 4 vol. gr. in-8° formant ensemble 3,600 pages, très largement illustrés de figures en noir et de planches en couleurs. *En souscription jusqu'à la publication du tome IV.* 150 fr.

Traité d'Hygiène, par A. Proust, professeur d'hygiène de la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie de médecine, inspecteur général des Services sanitaires. *Troisième édition revue et considérablement augmentée,* avec la collaboration de A. Netter, professeur agrégé à la Faculté de médecine, membre du Comité consultatif d'hygiène publique de France, et H. Bourges, chef du laboratoire d'hygiène à la Faculté de médecine. 1 vol. in-8, avec figures et cartes dans le texte, publié en 2 fascicules. *En souscription*........ 18 fr.

Les Maladies infectieuses, par G.-H. Roger, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin des hôpitaux. 1 vol. in-8 de 1,520 pages, avec figures dans le texte, publié en 2 fascicules.......... 28 fr.

L'Immunité dans les Maladies infectieuses, par Elie Metchnikoff, membre étranger de la Société royale de Londres, professeur à l'Institut Pasteur. 1 vol. in-12, avec 45 figures dans le texte.......... 12 fr.

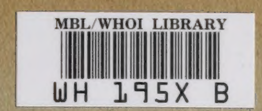
Maladies du Cuir chevelu. — I. Les Maladies séborrhéiques : *Séborrhée, Acnés, Calvitie,* par le Dr R. Sabouraud, chef du laboratoire de la Ville de Paris à l'hôpital Saint-Louis. 1 vol. in-8, avec 91 figures dans le texte, dont 40 aquarelles en couleurs.......... 10 fr.

Collection de Planches murales destinées à l'enseignement de la bactériologie, publiée par l'Institut Pasteur de Paris. La collection comprend actuellement 65 planches du format 80 × 62 centimètres, tirées sur papier toile très fort et munies d'œillets permettant de les suspendre sur 2 pitons. La collection entière est réunie dans un carton disposé spécialement à cet effet ; elle est accompagnée d'un texte explicatif rédigé en trois langues (français, allemand, anglais). Prix de la collection, port en sus.......... 250 fr.

Les Maladies microbiennes des Animaux, par MM. Ed. Nocard, professeur à l'École d'Alfort, membre de l'Académie de Médecine, et E. Leclainche, professeur à l'École vétérinaire de Toulouse. Ouvrage couronné par l'Académie des Sciences, Prix Monthyon (1898). *Troisième édition* entièrement refondue et considérablement augmentée. 2 volumes grand in-8°, formant ensemble 1,312 pages.......... 22 fr.

Précis de Bactériologie médicale, par Fernand Berlioz, professeur à l'Université de Grenoble, directeur du Bureau municipal d'hygiène et de l'Institut sérothéraphique, avec préface par L. Landouzy, professeur de clinique médicale à la Faculté de médecine de Paris. 1 vol. in-16, de la collection Diamant, avec figures dans le texte, cartonnage à l'anglaise, tranches rouges... 6 fr.

Sceaux. — Imp. Charaire.


MBL/WHOI LIBRARY
WH 195X B